

# LC-MS/MS 研究新型酪氨酸酶抑制剂 UP302 在大鼠肝微粒体中代谢的酶动力学

朱凌, 张双庆\*, 闻镍, 于敏, 李佐刚\* (中国食品药品检定研究院, 国家药物安全评价监测中心, 北京 100176)

**摘要:**目的 建立并验证测定大鼠肝微粒体孵育液中 UP302 含量的高效液相色谱-串联质谱法, 研究 UP302 在大鼠肝微粒体中代谢的酶动力学。方法 经大鼠肝微粒体孵育的 UP302 样品, 经色谱柱分离, 电喷雾离子化负离子检测, 扫描方式为选择反应监测, 用于定量分析的离子反应分别为  $m/z$  301.1 $\rightarrow$ 135.2 (UP302) 和  $m/z$  252.9 $\rightarrow$ 132.0 (内标大豆苷元)。考察不同孵育时间、底物浓度和微粒体浓度对 UP302 代谢的影响, 确定最佳反应条件。结果 标准曲线线性范围为 0.1~20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 线性关系良好, 日内日间准确度在 86.42%~112.59%, 日内日间精密度均小于 9.09%, 回收率在 100.50%~109.91% 之间。确定了酶动力学参数, 最大反应速度  $V_{\max}$  为 196.08  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ , 米氏常数  $K_m$  为 14.98  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 内在代谢清除率  $CL_{\text{int}}$  为 13.09  $\text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结论 该检测方法快速、专属、灵敏度高, 可满足酶动力学检测要求。

**关键词:** UP302; 肝微粒体; 酶动力学; 液相色谱-质谱联用法

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)21-1665-05

## Study on Metabolism Enzyme Kinetics of a Natural Novel Tyrosinase Inhibitor UP302 in Rat Liver Microsome by LC-MS/MS

ZHU Ling, ZHANG Shuang-qing\*, WEN Nie, YU Min, LI Zuo-gang\* (National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish and validate a LC-MS/MS method for the determination of UP302 in rat liver microsome, and study the enzyme kinetics of UP302 metabolism in rat liver microsome. **METHODS** The LC-MS/MS method with mass transitions of  $m/z$  301.1 $\rightarrow$ 135.2 for UP302 and 252.9 $\rightarrow$ 132.0 for internal standard daidzein was employed to determine UP302 incubated in rat liver microsome at negative electrospray ionization mode. Different incubation conditions, such as incubation time, substrate concentration and microsome concentration, were optimized. **RESULTS** The linear range of the calibration curve was 0.1~20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  with good linear relationship. The intra- and inter-day accuracy was 86.42%~112.59%, and RSDs were less than 9.09%. The enzyme kinetic parameters were as follows: maximum reaction speed  $V_{\max}$  of 196.08  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $K_m$  of 14.98  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , and  $CL_{\text{int}}$  of 13.09  $\text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ . **CONCLUSION** The established LC-MS/MS method was fast, simple, specific, sensitive and successfully applied to investigate the enzyme kinetics of UP302 metabolism in rat liver microsome.

**KEY WORDS:** UP302; liver microsome; enzyme kinetics; LC-MS/MS

酪氨酸酶是一种含铜的金属氧化还原酶, 在动植物、微生物及人体中广泛分布。酪氨酸酶催化酪氨酸羟化转变成多巴, 同时氧化多巴形成多巴醌, 多巴醌再经过一系列反应, 最后形成黑色素<sup>[1]</sup>。有关研究表明, 酪氨酸酶活性与黑色素的生成量呈正相关<sup>[2]</sup>。酪氨酸酶在黑色素的生物合成过程中起着关键性的作用, 是皮肤黑色素合成反应的限速酶, 参与决定了哺乳动物皮肤、头发等器官组织的颜色。过量水平的黑色素在表皮沉积可能导致如黄褐斑、雀斑等色素障碍性皮肤病。酪氨酸酶抑制剂通过抑

制酪氨酸酶的活性, 阻止酪氨酸向黑色素转化。研发能抑制酪氨酸酶活性的物质将成为治疗色素障碍性皮肤病的重要手段。此外, 酪氨酸酶还参与果蔬的褐变反应, 所以酪氨酸酶抑制剂也可作为食品保鲜剂。同时, 它还能作为生物杀虫剂应用于农业的抗虫领域<sup>[3]</sup>。近年来, 国内外学者致力于寻找特异、高效的酪氨酸酶抑制剂, 酪氨酸酶抑制剂的研究已成为热点领域之一<sup>[4]</sup>。

UP302 是从药用植物山萮兰中分离得到的一种新型酪氨酸酶抑制剂, 化学名称为 1-(2,4-二羟苯

作者简介: 朱凌, 女, 硕士研究生 研究方向: 药代动力学 \* 通讯作者: 张双庆, 男, 博士, 助理研究员 研究方向: 药代动力学与药剂学  
Tel: (010) 67872233-8220 E-mail: zhangshq@hotmail.com; 李佐刚, 男, 研究员 研究方向: 药代动力学 Tel: (010) 67872233-8312  
E-mail: lizg428@nicpbp.org.cn

基) 3-(2,4-二甲氧基-3-甲苯) 丙烷。研究表明, UP302 表现出很高的酪氨酸酶抑制活性,  $IC_{50}$  值为  $0.24 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 它可以显著改善皮肤的外表, 能够减少皮肤色素沉积, 改善皮肤光泽, 而没有普通化学成分的不良反应; 它的美白效果比常用的对苯二酚和曲酸等美白剂的美白效果高 20 倍, 且没有不良反应<sup>[5-6]</sup>。UP302 可用于乳霜、洗液、胶类、面膜和其他化妆品中, 其浓缩物用量仅为普通化学物质的 1/10 ~ 1/50, 可能是个前景看好的美白成分。UP302 作为一种新型酪氨酸酶抑制剂, 不仅是化妆品原料药的主要成分之一, 由于对由于黑色素增加引起的色素障碍性皮肤病其具有潜在的治疗作用, 目前也正将其开发为治疗色素障碍性皮肤病的新型药物。

由于 UP302 是一种新型酪氨酸酶抑制剂, 笔者尚未见有体外大鼠微粒体中代谢酶动力学的研究报道。本实验建立了一种灵敏且特异性的 LC-MS/MS 方法来测定 UP302, 为其临床前及临床研究奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

TSQ Quantum Access 型 LC-MS/MS(美国 Thermo Fisher 公司), 三重四级杆电喷雾离子化电离源。Eppendorf 5415R 低温高速离心机, NTS-1300 水浴摇床, DW-86L626 超低温冰箱。

UP302 原料(纯度 99%, 美国 Unigen 公司); 大豆苷元对照品(批号 111502-200402, 中国食品药品检定研究院)。甲醇(色谱纯), 二甲基亚砜(DMSO)(分析纯);  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甲酸铵溶液(色谱级)。  $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  大鼠肝微粒体,  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液, NADPH 再生系统包括 NADPH-A 和 NADPH-B(美国 BD Gentest 公司, 临用前按 5:1 混合)。NADPH-A 含有  $31 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NADPH<sup>+</sup> 和  $66 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  6-磷酸葡萄糖(G-6-P), NADPH-B 含  $40 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH)(溶于  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$  中)。

### 1.2 溶液配制

**1.2.1 UP302 储备液的配制** 称取 UP302 适量, 加入适量 DMSO, 超声直至完全溶解, 得到质量浓度为  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的贮备溶液,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  储存。

**1.2.2 内标大豆苷元储备液的配制** 称取大豆苷元对照品适量, 加入适量甲醇, 超声直至完全溶解, 得到质量浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准贮备溶液,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  储存。

**1.2.3 UP302 和大豆苷元工作液的配制** 取  $10$

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  UP302 储备液, 经  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液系列稀释, 得到质量浓度为  $0.2, 1, 2, 4, 10, 20, 30, 40, 60, 100, 1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的工作液。

大豆苷元储备液经甲醇稀释得到  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  大豆苷元甲醇工作液, 于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中储存, 备用。

### 1.3 色谱条件

Hypersil Gold  $C_{18}$  色谱柱( $2.1 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}, 1.9 \mu\text{m}$ , Thermo Fisher Inc., Waltham, MA, USA), 配有预柱 Phenomenex  $C_{18}$  ( $3.0 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$ ); 流速为  $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 柱温为  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 进样量为  $10 \mu\text{L}$ ; 整个分析时间为  $6 \text{ min}$ ; 流动相采用梯度洗脱, [ $0 \sim 0.5 \text{ min}$ , A 和 B 比例为  $10:90$ ,  $0.5 \sim 2.0 \text{ min}$  A 和 B 比例从  $10:90$  上升至  $90:10$ ;  $2.0 \sim 5.0 \text{ min}$  维持 A 和 B 比例  $90:10$  不变;  $5.0 \sim 5.1 \text{ min}$  A 和 B 比例从  $90:10$  下降至  $10:90$ ;  $5.1 \sim 6.0 \text{ min}$  维持 A 和 B 比例  $10:90$  不变], 流动相: A 相为甲醇, B 相为  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  甲酸铵水溶液。

### 1.4 质谱条件

电喷雾离子化电离源, 喷雾电压  $3000 \text{ V}$ ; 加热毛细管温度  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 鞘气氮气, 流速  $30 \text{ Arb}$ ; 辅助气氮气, 流速  $10 \text{ Arb}$ ; 碰撞气氩气, 流速  $1.5 \text{ mTorr}$ 。UP302 和大豆苷元的二级碰撞能量分别为  $31$  和  $39 \text{ eV}$ ; 负离子方式检测; 扫描方式为选择反应监测(SRM), 用于定量分析的离子反应分别为  $m/z$   $301.1 \rightarrow 135.2$  (UP302) 和  $m/z$   $252.9 \rightarrow 132.0$  (内标大豆苷元); 扫描时间为  $0.2 \text{ s}$ 。

### 1.5 温孵条件

取  $150 \mu\text{L}$  UP302 工作液至  $1.5 \text{ mL}$  离心管中, 加入新鲜配制的  $60 \mu\text{L}$   $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  大鼠肝微粒体,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育  $5 \text{ min}$ , 然后加入在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  预孵育  $5 \text{ min}$  的新鲜配制 NADPH 再生系统  $90 \mu\text{L}$ , 于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴中震荡温孵, 启动反应, 开始计时。孵育总体积为  $300 \mu\text{L}$ , 其中肝微粒体蛋白浓度为  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , NADPH 浓度为  $1.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , DMSO 浓度不超过  $0.1\%$ 。

### 1.6 样品处理

取肝微粒体温孵液  $20 \mu\text{L}$ , 加入冰冷的内标大豆苷元甲醇溶液(含内标  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )  $60 \mu\text{L}$ , 终止反应同时沉淀蛋白, 涡旋  $30 \text{ s}$ , 于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $10 \text{ min}$ , 取上清  $10 \mu\text{L}$  进样分析。

## 2 结果

### 2.1 方法学验证

**2.1.1 专属性** 分别将灭活的空白肝微粒体稀释液, 孵育  $2 \text{ min}$  后的 UP302 样品, 按照“1.6”项下的

方法处理后,进行 LC-MS/MS 分析,结果见图 1。比较可见,内标大豆苷元与 UP302 的保留时间分别为 3.49 和 4.10 min,能够达到完全分离,相互不干扰,内源性杂质对样品也无干扰。

**2.1.2 线性** 灭活空白肝微粒体中加入不同浓度的 UP302 溶液及内标溶液,得到终浓度为 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 和 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的肝微粒体系列溶液。分别按“1.6”项下的方法处理后,进行 LC-MS/MS 分析,连续 5 d 操作。将 UP302 与内标大豆苷元的峰面积比( $Y$ )对加入的 UP302 的终浓度( $X$ )按照最小二乘法进行线性回归,标准曲线线性范围为 0.1 ~ 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,结果见表 1。相关系数  $r = 0.9964$ ,表明线性关系良好。

**2.1.3 精密度、准确度与提取回收率** 分别于灭活的肝微粒体稀释液中加入高、中、低浓度的 UP302 溶液,按“1.6”项下的方法测定,以空白甲醇溶液为对照,用标准曲线计算 UP302 在微粒体体系中的日内、日间精密度和准确度及提取回收率,结果见表 2。日内日间准确度在 86.42% ~ 112.59%,日内日间精密密度均小于 9.09%,回收率在 100.50% ~ 109.91%。内标大豆苷元的提取回收率为(89.82 ± 1.97)%。

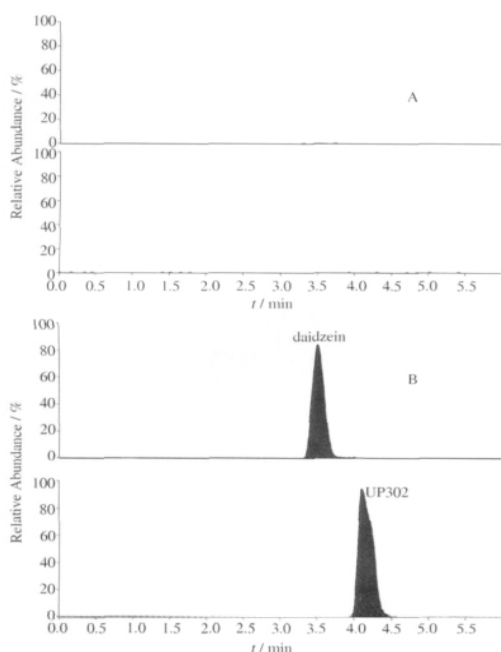


图 1 空白大鼠肝微粒体(A)、加入 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  UP302 微粒体孵育 2 min 后样品(B)的 SRM 色谱质谱图

Fig.1 SRM Chromatograms of blank rat liver microsome (A), microsome spiked with 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  UP302 after incubation for 2 min (B)

表 1 UP302 在大鼠肝微粒体中标准曲线

Tab.1 Calibration curves of UP302 in rat liver microsome

Calibration curve	$r$
$Y = 0.01365X - 0.002588$	0.9964
$Y = 0.01155X - 0.002757$	0.9983
$Y = 0.01255X - 0.003932$	0.9994
$Y = 0.01427X - 0.001757$	0.9997
$Y = 0.01091X - 0.004053$	0.9994

表 2 UP302 日内、日间精密度和准确度及提取回收率.  $n = 5$

Tab.2 Intra- and inter-day precision, accuracy and extraction recovery of UP302.  $n = 5$

Concentration / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Intra-day / %		Inter-day / %		Recovery / %	
	Accuracy	RSD	Accuracy	RSD	Accuracy	RSD
0.5	100.49	5.69	100.50	5.22	82.50	9.40
5	104.98	6.35	105.11	6.20	89.60	7.40
10	109.54	7.13	109.91	7.01	87.70	1.10

## 2.2 UP302 体外代谢影响因素

考察不同孵育时间、底物浓度和微粒体浓度对 UP302 代谢的影响,以此来确定最佳的反应条件。

**2.2.1 孵育时间** 按“1.5”项下方法孵育后,启动反应并开始计时。分别于温孵 0, 1, 2, 3, 4, 5 min, 各吸取 20  $\mu\text{L}$  该温孵液,按“1.6”项下方法处理后,取上清 10  $\mu\text{L}$  进 LC-MS/MS 分析测定。

结果代入随行的标准曲线计算得到各个时间点所剩的底物浓度,以剩余底物百分含量对时间做线性回归曲线,即得到孵育时间对体外肝微粒体中 UP302 代谢的影响关系。

UP302 温孵不同时间后的剩余百分含量见图 2。微粒体质量浓度为 0.2  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,底物浓度为 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,底物 UP302 在 0 ~ 5 min 呈良好的线性消除关系; UP302 的剩余百分含量( $Y$ )对孵育时间( $t$ )的线性回归方程为:  $Y = -11.99t + 96.13$ ,  $r = 0.9933$ 。在此条件下,选择线性范围内底物代谢量为 30% 左右的时间点 2 min 作为最佳孵育时间,用于酶促反应动力学参数的测定实验。

**2.2.2 底物浓度** 加入不同浓度的 UP302 工作液,按“1.5”项下方法孵育后,其中肝微粒体蛋白质量浓度为 0.2  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,底物 UP302 的浓度分别为 1, 2, 5, 10, 15, 20 和 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , NADPH 浓度为 1.1  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , DMSO 浓度不超过 0.1%。加入 NADPH 再生系统后立即置于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴中震荡温孵,启动反应并开始计时。分别于 0, 2 min 时各取出 20  $\mu\text{L}$  该温孵液,按“1.6”项下处理后,进 LC-MS/MS 分析测定。结果代入随行的标准曲线计算得到各个底物浓度时所剩的 UP302 浓度,以 UP302

剩余百分含量对底物浓度做图。

通过不同浓度的底物温孵后,UP302 的剩余含量百分比的变化曲线见图 3。当底物浓度大于  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时呈代谢饱和状态。故选择底物 UP302 的浓度为  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.2.3 肝微粒体浓度** 加入不同浓度的肝微粒体,按“1.5”项下方法孵育后,其中肝微粒体质量浓度分别为  $0.1, 0.2, 0.5, 0.8$  和  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 底物 UP302 的浓度为  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , NADPH 浓度为  $1.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , DMSO 浓度不超过  $0.1\%$ 。加入 NADPH 再生系统后立即置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $50 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  震荡温孵。启动反应并开始计时。分别于  $0, 2 \text{ min}$  时取出  $20 \mu\text{L}$  该温孵液,按“1.6”项下处理后,进 LC-MS/MS 分析测定。结果代入随行的标准曲线计算得到各温孵液中所剩的底物浓度,以 UP302 剩余百分含量对酶浓度进行线性回归,得到肝微粒体酶浓度对 UP302 的代谢的影响关系。

通过不同蛋白浓度温孵后,UP302 的剩余含量百分比的变化曲线见图 4,肝微粒体蛋白浓度在  $0.1 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,对底物 UP302 的代谢呈线

性消除关系;UP302 的剩余百分含量( $Y$ )对酶浓度( $\rho$ )的线性回归方程为:  $Y = -84.05\rho + 83.30, r = 0.9750$ 。选择  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  为最佳酶浓度。

**2.2.4 酶促反应动力学参数的测定** 为准确测定酶促反应动力学参数包括最大反应速度( $V_{\text{max}}$ )、米氏常数( $K_m$ )和内在代谢清除率( $CL_{\text{int}}$ ),选择最佳孵育时间与合适酶浓度,测定在不同底物浓度下底物被代谢的百分含量。根据米氏方程  $V = \frac{V_{\text{max}} \cdot C}{K_m + C}$  进行

变换,得到  $\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\text{max}}} \cdot \frac{1}{C} + \frac{1}{V_{\text{max}}}$ , 以  $1/V$  对  $1/C$  作图得到一条直线,截距为  $1/V_{\text{max}}$ ,斜率为  $K_m/V_{\text{max}}$ ,由此求出  $K_m$  和  $V_{\text{max}}$  值。固有清除率  $CL_{\text{int}} = V_{\text{max}}/K_m$ 。

将“2.2.2”项下实验结果以  $1/V$  对  $1/C$  作图,并以  $1/V$  对  $1/C$  进行线性回归,得到回归方程为  $Y = 0.0847X + 0.0036, r$  为  $0.9248$ ,见图 5。结果显示线性不太明显,表明 UP302 的代谢可能不止一种酶催化。由此计算得到  $V_{\text{max}}$  为  $196.08 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $K_m$  为  $14.98 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $CL_{\text{int}}$  为  $13.09 \text{ mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

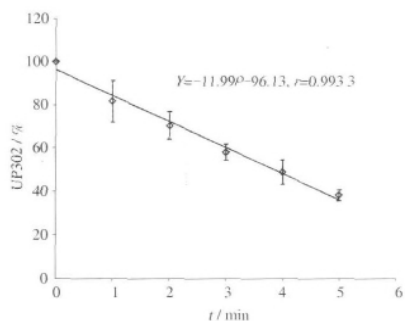


图2 孵育时间对 UP302 稳定性的影响.  $n = 3, \bar{x} \pm s$   
Fig.2 Influence of incubation time on UP302 stability in rat microsome.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

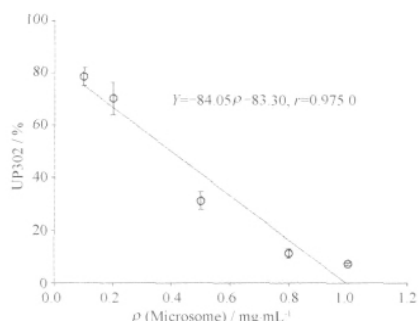


图4 肝微粒体浓度对 UP302 稳定性的影响.  $n = 3, \bar{x} \pm s$   
Fig.4 Influence of microsome concentration on UP302 stability in rat microsome.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

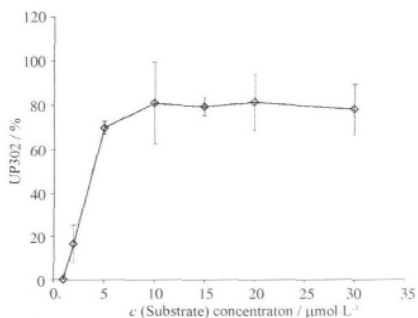


图3 底物浓度对 UP302 稳定性的影响.  $n = 3, \bar{x} \pm s$   
Fig.3 Influence of substrate concentration on UP302 stability in rat microsome.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

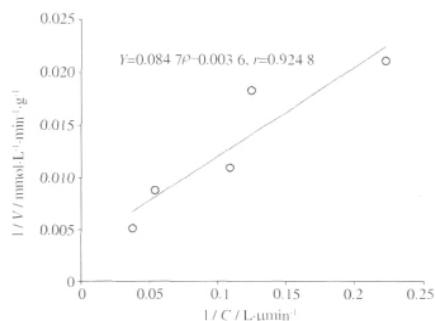


图5 不同底物浓度下  $1/V$  对  $1/C$  的线性回归  
Fig.5  $1/V - 1/C$  Profile at different substrate concentration

### 3 讨论

生物样本的分析一般具有待测药物浓度低、取样量少、内源性杂质多、不易重复获得等特点,这就要求所采用的分析方法必须灵敏、专属、精确、可靠。目前生物样本常用的分析方法有:①色谱法;②免疫学方法;③微生物学方法。当今生物样本分析首选色谱法,如 HPLC、GC、LC/MS、LC-MS/MS、GC/MS 等,这类方法应用最广,大约 90% 的药物测定都可以用色谱法来完成。作为一种高灵敏度的检测手段的 LC-MS/MS 在本实验中得到应用。

本检测方法可使 UP302 和内标达到完全分离,内源性杂质对内标和 UP302 的测定没有干扰,方法专属性良好,标准曲线检测限低,检测灵敏度高,为 UP302 的酶动力学研究提供了可靠的分析手段。在选用等度条件下洗脱时,色谱峰形较差,峰形严重拖尾且出现分叉现象。后改为梯度洗脱,分析速度快,峰形也较好,分离条件较理想。在选择定量碎片离子时根据远离母离子、裂解方式稳定、质荷比稳定且左右干扰少以及碎片离子有足够的丰度的原则。依据此原则分别选择了 UP302 和大豆昔元含量测定的定量离子,同时优化了碰撞电压和碰撞能量等参数。

大多数药物的代谢都是细胞内特异酶催化的反应,体外药物代谢的酶促反应可排除机体各种混杂因素对药物代谢的影响,更能真实反映药物代谢酶与药物相互作用的关系及其体内药动学规律。因此,研究 UP302 在肝微粒体中的代谢,我们首先要对其酶促动力学特征进行考察,本实验结果显示,在  $0.5 \sim 10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  内 UP302 代谢消除量与底物浓度的增加呈近似线性增加,而在浓度大于  $10.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,UP302 的代谢呈现饱和状态,这表示 UP302 的代谢转化完全符合酶促动力学特征。

根据 2006 年美国 FDA 颁布的《Drug interaction studies study design, data analysis, and implications for dosing and labeling》批导原则规定了 CYP 酶抑制剂体外实验设计注意事项:① $\text{IC}_{50}$  测定时,在底

物代谢率允许的情况下,尽量使底物的浓度低于其  $K_m$  值,使  $\text{IC}_{50}$  与其  $K_i$  值更具相关性;②肝微粒体蛋白浓度通常  $< 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;③缓冲液的性质、pH 对  $V_{\text{max}}$  和  $K_m$  的影响显著,尽可能采用标准化的分析条件;④反应系统中最好控制底物或抑制剂的消耗不超过 10% ~ 30%,但是对于  $K_m$  值很低的药物来说,控制反应体系底物消耗  $< 10\%$  很困难;⑤建议建立时间-产物形成量的线性关系;⑥建议建立酶量-产物形成量的线性关系;⑦因为某些有机溶剂具有酶诱导或抑制作用,溶剂的浓度都要  $< 1\% (v/v)$ ,最好  $< 0.1\%$ ,实验应包括无溶剂对照和溶剂对照;⑧实验应该有一个已知抑制剂的阳性对照。

根据此原则和实验结果确定了本动力学实验中最佳孵育时间为 2 min,最佳底物浓度为  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,肝微粒体蛋白浓度选择了  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。酶促反应动力学参数的测定结果表明 UP302 在代谢过程中可能不止一种酶催化,如要确定是哪些酶还需进一步实验进行验证。

### REFERENCES

- [1] KOBAYASHI T, VIEIRA W D, POTTERF B, *et al.* Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis [J]. *J Cell Sci*, 1995, 108 ( Pt 6 ): 2301-2309.
- [2] KUBO I, YOKOKAWA Y, KINST-HORI I. Tyrosinase inhibitors from bolivian medicinal plants [J]. *J Nat Prod*, 1995, 58(5): 739-743.
- [3] DING D P, MA W L, ZHENG W L. Development of tyrosinase inhibitors [J]. *J Prac Med (实用医学杂志)*, 2005, 21(12): 1364-1366.
- [4] ZOU X W, JIANG Z S. Advances in studies on botanical inhibitors of tyrosinase [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2004, 35(6): 702-705.
- [5] NESTEROV A, ZHAO J, MINTER D, *et al.* 1-(2, 4-Dihydroxyphenyl)-3-(2, 4-dimethoxy-3-methylphenyl) propane, a novel tyrosinase inhibitor with strong depigmenting effects [J]. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56(9): 1292-1296.
- [6] MAMMONE T, MUIZZUDDIN N, DECLERCQ L, *et al.* Modification of skin discoloration by a topical treatment containing an extract of dianella ensifolia: a potent antioxidant [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2010, 9(2): 89-95.

(收稿日期: 2011-06-14)

欢迎投稿 欢迎订阅 欢迎刊登广告