

文章编号: 1674-5566(2019)04-0634-09

DOI:10.12024/jsou.20181202492

## 溶栓候选药物双吡啶海洋生物碱 FGFC1 的转化特性

张本帅<sup>1</sup>, 姜胜男<sup>2</sup>, 杨 晶<sup>2</sup>, 钱士云<sup>2</sup>, 马子宾<sup>3</sup>, 郭锐华<sup>1</sup>, 包 斌<sup>1</sup>, 吴文惠<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 国家淡水水产品加工技术研发分中心, 上海 201306)

**摘要:** 研究新型海洋纤溶化合物 FGFC1 体外药物代谢动力学特征及其转化产物。从 Wistar 大鼠获得肝微粒体, lowry 法检测肝微粒体蛋白浓度, HPLC 方法检测 FGFC1 及其转化产物的增减, LC-MS/MS 方法分析和鉴定 FGFC1 的转化产物, 4-苯基-1,2,3-噻二唑、去乙酰环丙氯地孕酮、苯妥英钠和酮康唑为 CYP450 酶系亚型的选择性抑制剂。结果显示, FGFC1 的体外代谢半衰期  $T_{1/2} = (96.25 \pm 2.3) \text{ min}$ , 固有清除率  $CL_{\text{int}} = (0.0720 \pm 0.0014) \text{ mL}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。FGFC1 的唯一转化产物是 ((2S,3S)-2-((E)-7,8-dihydroxy-4-methylnon-3-en-1-yl)-3,5,8-trihydroxy-2-methyl-3,4,8,9-tetrahydropyrano[2,3-e]isindol-7(2H)-one) (PIO), 其分子质谱和片段峰(m/z)分别为  $463.20[\text{M} + \text{C}_2\text{H}_3\text{N} + \text{H}]^+$  和  $m/z 110.90[\text{C}_7\text{H}_8\text{O} + \text{H}^+]^+$ 、 $215.70[\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_2 + \text{H}]^+$ 、 $337.00[\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_5]^+$ 、 $337.00[\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{NO}_2]^+$ 。苯妥英钠显著抑制肝微粒体酶系 CYP3A4 亚型, FGFC1 的转化产物 PIO 被减少 49.11%。研究表明, 肝微粒体 CYP3A4 亚型酶系通过 N-脱烷基反应、N-氧化反应和水解反应转化 FGFC1 为 PIO。

**关键词:** 肝微粒体; FGFC1; 生物转化; 半衰期; PIO

**中图分类号:** R 961 **文献标志码:** A

FGFC1 是海洋真菌长孢葡萄穗霉菌 FG216 (*Staohybotrys Longispora* FG216) 的次级代谢产物, 是具有溶栓药效的双吡啶海洋生物碱<sup>[1]</sup>。FGFC1 作用机理为提高血液纤溶因子纤溶酶促进血栓溶解, 该途径纤溶反应平稳且安全高效, 因此 FGFC1 具有成为小分子溶栓候选药物的潜力<sup>[2]</sup>。已有研究通过比格犬模型内药物代谢动力学特征及组织分布特征<sup>[3]</sup>、异硫氰酸荧光素-纤维蛋白降解法、急性肺血栓大鼠模型法<sup>[4]</sup>, 证明 FGFC1 具有良好溶栓效果, 能在比格犬体内迅速代谢, 且滞留时间长, 吸收后组织分布广泛, 能很好地发挥生物学作用, 表明 FGFC1 具有良好的成药性。

肝微粒体体外实验对药物浓度和反应时间的可控性高, 可模拟药物的肝脏代谢。目前, 已有研究利用体外肝微粒体体系分析槟榔碱与槟榔次碱转化为去甲基槟榔碱和去甲基槟榔次

碱<sup>[5]</sup>、白屈菜碱的体外药代动力学特征及其生物转化过程<sup>[6]</sup>。但对于双吡啶类生物碱生物转化过程的研究, 目前尚未见报导。

构建体外肝微粒体体系研究 FGFC1 的生物转化过程, 分析其体外药物代谢动力学特征及其转化产物, 可进一步阐明 FGFC1 体内代谢规律, 为 FGFC1 作为新型溶栓药物的使用提供理论基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 样品与试剂

##### 1.1.1 样品

FGFC1 由上海海洋大学海洋药物实验室制备(纯度 > 98%, 溶解度为 12.5 mg/mL), 分子结构见图 1。

##### 1.1.2 试剂

NADPH(还原性辅酶 II, 上海罗氏制药有限

收稿日期: 2018-12-28 修回日期: 2019-03-14

基金项目: 国家自然科学基金(81502955, 81750110548); 上海市科技创新行动计划(17490742500)

作者简介: 张本帅(1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为海洋药物。E-mail: 547034775@qq.com

通信作者: 吴文惠, E-mail: whwu@shou.edu.cn

公司),甲醇、乙腈(色谱纯,均购自国药集团化学试剂有限公司),Tris-HCl 缓冲液(pH = 7.4)、PBS 缓冲液(pH = 7.4)、乙酸乙酯、氯化钙、碳酸氢钠、蔗糖(分析纯,均购自国药集团化学试剂有限公司),三氟乙酸(色谱纯,美国 Sigma 公司),Folin 试剂(美国 Sigma 公司),牛血清白蛋白、4-苯基-1,2,3-噁二唑、去乙酰环丙氯地孕酮和苯妥英钠(百灵威化学试剂有限公司)。

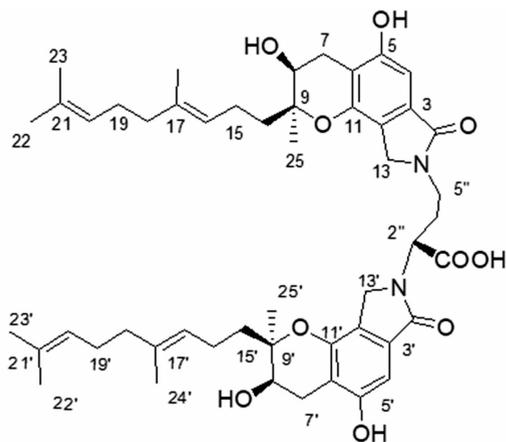


图 1 FGFC1 的分子结构式

Fig. 1 Molecular structure of FGFC1

### 1.1.3 仪器

主要仪器:高速冷冻离心机(CR21G 型,日本日立公司),酶标仪(CORONA SH-1000 型,上海天美生化仪器有限公司),超高速冷冻离心机(Hitachi himac CP70ME 型,德国 IKA 公司),高效液相色谱仪(HITACHI L-2000 型,日本日立公司),制备型高效液相色谱仪(P270 型,大连依利特有限公司),组织匀浆机(R104 型,德国 IKA 公司),超纯水净化系统(Direct-Q3 型,默克密理博公司),96 孔板(美国康宁公司),超低温冰箱(DW-8GL388 型,中科美菱有限公司),液相色谱质谱联用仪(TSQ-VANTAGE 型,赛默飞世尔科技有限公司)。

### 1.2 实验动物

Wistar 大鼠购自上海杰思捷动物实验动物中心[SCXK(沪)201703213],体质量为 350 ~ 400 g,7 ~ 9 周龄,共 4 只。

在动物房适应性饲养一周,相对湿度 50% ± 5%,温度(25 ± 2)℃,自然正常通风,昼夜自由饮水和进食。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 大鼠肝微粒体制备

超高速离心法和钙离子沉淀法制备大鼠肝微粒体<sup>[7]</sup>。

配置 0.9% 生理盐水注射液,SD 大鼠适应性饲养后,连续尾静脉注射 3 日,每日 1 次,每次注射剂量 2 mL。

大鼠最后一次静脉注射 12 h 后,禁食不禁水,再经 12 h 麻醉后处死,解剖取肝脏,冰浴的生理盐水冲洗净血污,手术剪剪为肝脏小块,冰浴的蔗糖溶液冲洗至肝脏小块呈无色,按 1:4 (W/V) 的比例加入蔗糖溶液,冰浴条件匀浆 1 min,匀浆液称重后分装至离心管中。

4 ℃ 下 25 000 g 离心 25 min,取上清液,加入 CaCl<sub>2</sub> 溶液(调整 Ca<sup>2+</sup> 的浓度至 8 mmol/L),置于超速离心管,4 ℃、100 000 g 条件下离心 60 min,弃上清液取沉淀,用 Tris-HCl 溶液混悬均匀,再次以 4 ℃、100 000 g 条件离心 60 min。取沉淀用 Tris-HCl 缓冲液按照 1:2 (W/V) 的比例混悬均匀,分装后置于 -80 ℃ 冰箱保存备用。

#### 1.3.2 肝微粒体蛋白浓度测定

采用 Lowry 法<sup>[8]</sup>,按照标准方法制备,构建牛血清白蛋白标准曲线,测定肝微粒体浓度。

#### 1.3.3 FGFC1 内标定量检测方法

精密称取 FGFC1 适量,以碳酸氢钠为溶媒(FGFC1 /NaHCO<sub>3</sub>, m /m, 1:1) 配置原液,连续稀释至 0.5、1、5、10、15、20、25 μg/mL。所有样品用乙腈提取,0.22 μm 滤膜过滤后进行 HPLC 检测。以 FGFC1 的峰面积(Y)对 FGFC1 的浓度(X)进行线性回归,用于后续肝微粒体体系中 FGFC1 定量。

#### 1.3.4 FGFC1 药物代谢动力学特征分析方法

反应体系总体积 400 μL,反应体系以肝微粒体为代谢酶,使用 NADPH 来启动反应<sup>[8]</sup>,冰浴的乙酸乙酯终止反应,PBS 用于补充体积,同时设无 NADPH 的对照组。体外反应体系各组分终浓度:肝微粒体蛋白质浓度 0.1 mg/mL,NADPH 1.0 mmol/L,FGFC1 14.0 μg/mL。反应体系加入 FGFC1,37 ℃ 的恒温培养箱中预孵育 5 min,加入 NADPH 启动反应,反应时间为 0、1、5、15、30、40、60 和 120 min 时,分别加入 200 μL 冰冷的乙酸乙酯终止反应,设置 3 组平行对照。样品经 1.3.8 步骤处理后进行 HPLC 分析,用 1.3.3 建立的线性

回归方程计算 FGFC1 及其转化产物的浓度,以反应时间 0 min 的浓度作为 100%,其他各时间点的百分比剩余量的自然对数作线性回归,依据公式(1)和(2)计算 FGFC1 的体外半衰期  $T_{1/2}$  和固有清除率  $CL_{int}$  [10]。

$$T_{1/2} = -0.693/k \quad (1)$$

$$CL_{int} = -0.693/T_{1/2} \times v/m \quad (2)$$

式中: $k$  为各时间点的百分比剩余量的自然对数作线性回归后的斜率; $v$  为反应体系体积, mL;  $m$  为肝微粒体酶含量, mg。

### 1.3.5 准确度与精密性

在肝微粒体反应体系中加入 FGFC1 标准液,浓度分别为 1  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ 、50  $\mu\text{g/mL}$ ,按 1.3.4 节中的方法处理后,检测值与真实值(平均值)的接近程度定义为准确度,测定 FGFC1 的日内、日间相对标准偏差(RSD),对其检测值进行分析,并用 RSD 表示。

### 1.3.6 回收率

低、中、高 3 个浓度的质控样品(1、10、50  $\mu\text{g/mL}$ ),取定量样品按 1.3.4 步骤处理(不启动反应),混匀后经 125 000 g 离心 15 min,取上清液过滤进 HPLC 检测。经乙腈提取检测到的 FGFC1 浓度与质控样品检测到的 FGFC1 浓度比值为回收率。

### 1.3.7 方法专属性验证

分别设置空白肝微粒体组、空白肝微粒体加入 FGFC1(A) 和加入 NADPH 的温孵反应体系(B)。按 1.3.4 中的条件,观察方法的专属性和 FGFC1 在肝微粒体中的代谢稳定性[9]。

### 1.3.8 肝微粒体反应体系 FGFC1 的提取方法

37  $^{\circ}\text{C}$  肝微粒体反应体系孵育 FGFC1 为 1 ~ 120 min,加入 200  $\mu\text{L}$  冷冻乙酸乙酯终止反应,分层后取有机相,氮气干燥,干燥的样品用 HPLC 流动相复溶。该过程重复 3 次。流动相复溶后以 25 000 g 离心 15 min,0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,置于样品瓶中,进样量为 30  $\mu\text{L}$ ,按照 1.3.9 与 1.3.10 中条件进行 HPLC 分析。

### 1.3.9 FGFC1 的 HPLC 检测方法

液相色谱柱是 HP-C18 色谱柱(4.6  $\times$  250 mm,5  $\mu\text{m}$ ),柱温度:40  $^{\circ}\text{C}$ ,流动相:乙腈(A)和水(0.1% 三氟乙酸)(B),洗脱梯度:0 ~ 30 min,45% A ~ 15% A,55% B ~ 85% B,流速:1 mL/min,检测波长:265 nm [11]。

### 1.3.10 FGFC1 转化产物的 HPLC 检测方法

液相色谱柱是 HP-C18 色谱柱(4.6  $\times$  250 mm,5  $\mu\text{m}$ ),柱温度:40  $^{\circ}\text{C}$ ,流动相:5% 乙腈(A)和 0.1% 三氟乙酸(B),洗脱梯度:0 ~ 16 min,15% A ~ 55% A,85% B ~ 45% B,流速:1 mL/min,检测波长:265 nm [12]。

### 1.3.11 FGFC1 转化产物分离方法

制备型色谱柱是依利特 SinoChrom ODS-BP 色谱柱(20  $\times$  250 mm,10  $\mu\text{m}$ ),柱温度:40  $^{\circ}\text{C}$ ,流动相:5% 乙腈(A)和 0.1% 三氟乙酸(B),洗脱梯度:0 ~ 16 min,15% A ~ 55% A,85% B ~ 45% B,流速:10 mL/min,检测波长:265 nm。

### 1.3.12 FGFC1 转化产物质谱分析 [13]

1.3.11 节中分离纯化出的转化产物利用 LC-MS/MS 确定代谢产物的相对分子量后,对其结构进行初步推测,并基于此推测 FGFC1 在肝微粒体系统中的生物转化过程。

质谱柱是 HP-C18 色谱柱(4.6  $\times$  250 mm,5  $\mu\text{m}$ ),流动相:5% 乙腈(A)和 0.1% 三氟乙酸(B),洗脱梯度:0 ~ 16 min,15% A ~ 55% A,85% B ~ 45% B,电离模式:正离子检测模式,质核比检测条件:400 ~ 500,毛细管电压:3.0 kV,锥电压:40 kV,离子源温度 100  $^{\circ}\text{C}$ ,去溶剂化温度 450  $^{\circ}\text{C}$ ,去溶剂剂气体流量 900 L/h,流速为 50 L/h [14]。

### 1.3.13 FGFC1 的 CYP 代谢表型分析方法

参考文献 [15-16],设置添加 CY450 亚型抑制因子的实验组与无抑制因子的对照组。观察抑制不同 CYP450 亚型后 FGFC1 与 PIO 终浓度质量。对照组:在 1.3.4 节反应体系中,FGFC1 终质量浓度为 14  $\mu\text{g/mL}$ ;CYP2B4,CYP2E1 抑制组:FGFC1 终质量浓度为 14  $\mu\text{g/mL}$ ,同时添加 4-苯基-1,2,3-噁二唑,体系终质量浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$ ;CYP1A2 抑制组:FGFC1 终质量浓度为 14  $\mu\text{g/mL}$ ,同时添加去乙酰环丙氯地孕酮,体系终质量浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$ ;CYP2C9、CYP2C19 抑制组:FGFC1 终质量浓度为 14  $\mu\text{g/mL}$ ,同时添加苯妥英钠,体系终质量浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$ ;CYP3A4 抑制组:FGFC1 终质量浓度为 14  $\mu\text{g/mL}$ ,同时添加酮康唑,体系终浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$ 。上述 5 组在 37  $^{\circ}\text{C}$  的恒温培养箱中预孵育 5 min 后,加入 NADPH 启动反应,反应进行至 60 min,分别加入 400  $\mu\text{L}$  冰冷的乙酸乙酯终止反应。样品经 1.3.8 步骤处理后,HPLC 方法检测 FGFC1 及其代谢产

物的终浓度。

## 2 结果

### 2.1 肝微粒体蛋白浓度分析

采用 Lowry 法,用牛血清白蛋白为标准蛋白,在 0~500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的质量浓度范围内构建标准曲线,得到蛋白含量( $x$ ,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和吸光度值( $y$ )的线性关系为  $y = 0.0014x + 0.005$  ( $R^2 = 0.9991$ )。

基于标准曲线,4 只 Wistar 大鼠的肝微粒体蛋白质质量浓度分别是 ( $140.81 \pm 4.67$ )  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、( $236.14 \pm 19.69$ )  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、( $143.75 \pm 6.62$ )  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 ( $143.75 \pm 6.62$ )  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (图 2),构建肝微粒体系所需的微粒体蛋白终质量浓度为 0.1  $\text{mg}/\text{mL}$ <sup>[17]</sup>,制备的肝微粒体均大于该要求,可适用于后续实验。

### 2.2 FGFC1 内标定量检测方法适应性分析

#### 2.2.1 FGFC1 的标准曲线

在 1.3.9 节的分析条件下,构建的肝微粒体反应体系不干扰 FGFC1 以及内标的测定。FGFC1 在 0.1~15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的质量浓度范围内内呈

良好的线性关系  $y = 0.4561x + 0.0827$  ( $R^2 = 0.997$ ),检测下限为 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

#### 2.2.2 准确度与精密度

FGFC1 的日内和日间精密度 RSD 均小于 5%,表明该方法满足分析样品中未知药物浓度的要求(表 1)。

准确度 RSD 值均小于 6%(表 1),表明该方法能满足 FGFC1 及其转化产物定量检测的需要。

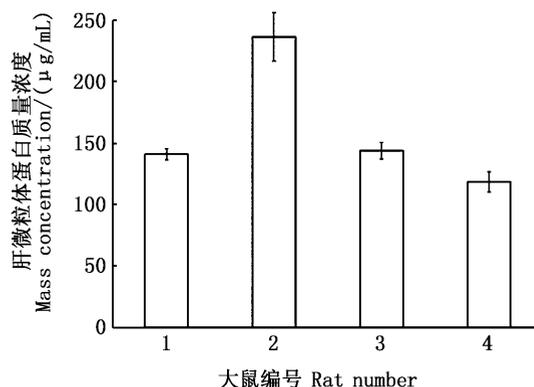


图 2 Wistar 大鼠的肝微粒体蛋白质量浓度  
Fig. 2 Liver microsomal protein mass concentration in Wistar rats

表 1 FGFC1 样品准确度,日间、日内精密度及其 RSD

实际质量浓度 Actual mass concentration/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	准确度% Accuracy	日内精确度 Intraday accuracy		日间精确度 Daytime precision	
		实测质量浓度 Measured mass concentration/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	RSD%	实测质量浓度 Measured mass concentration/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	RSD/%
1.0	3.0	$0.96 \pm 0.03$	3.12	$0.961 \pm 0.05$	4.16
14	3.2	$13.66 \pm 0.08$	0.58	$13.47 \pm 0.25$	1.85
28	5.8	$28.05 \pm 0.16$	0.64	$28.12 \pm 1.11$	3.95

#### 2.2.3 回收率

方法的回收率平均值均大于 97%,RSD 均在

4% 以内(表 2),表明从肝微粒体中提取的样品在保存和处理过程中均稳定,未发生明显的降解。

表 2 FGFC1 在体外肝微粒体系中的回收率及其 RSD

实际质量浓度 Actual mass concentration/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	实测质量浓度 Measured mass concentration/%	回收率 Recovery rate/%	RSD/%
1.0	$0.97 \pm 0.06$	$97.00 \pm 4.00$	4.12
14	$14.06 \pm 0.34$	$100.42 \pm 2.42$	2.41
28	$27.95 \pm 0.19$	$99.82 \pm 0.67$	0.67

#### 2.2.4 FGFC1 在大鼠肝微粒体系中代谢的方法专属性及稳定性

空白肝微粒体组(a)、未加入 NADPH 组(b)与加入 NADPH 组(c)的 HPLC 分析结果见图 3,

对比空白肝微粒体组,FGFC1 和其他峰分离良好,在肝微粒体中无内源性物质干扰测定,说明本方法的专属性高。在未加入 NADPH 的组中,FGFC1 不发生代谢转化。在加入 NADPH 的实验

组中,FGFC1 浓度减少。3 组平行以 60 min 反应时间为基准的剩余率分别为 42.23%、40.38% 和 41.91%, 表明 FGFC1 可以在 NADPH 的作用下在肝微粒体体系中发生生物转化。

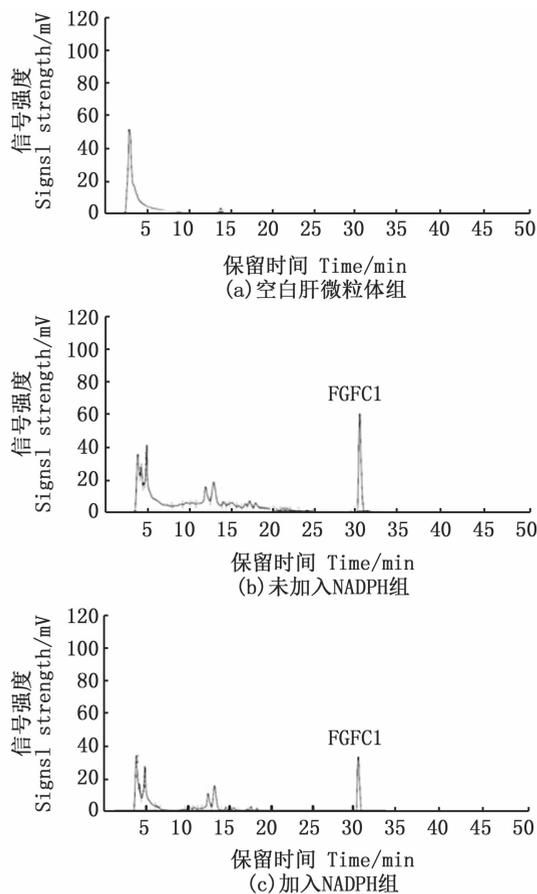


图3 方法专属性及稳定性验证( $n=3$ )HPLC 检测图谱  
Fig. 3 Method specificity and stability verification ( $n=3$ ) HPLC detection pattern

### 2.3 FGFC1 肝微粒体模型中的药物代谢动力学特征

HPLC 分析结果表明,FGFC1 能在肝微粒体中发生生物转化,FGFC1 在 1~15 min 时转化速率较快,转化速率逐渐趋于平缓,60 min 后几乎观察不到 FGFC1 质量浓度的减少,体外肝微粒体模型药代动力学( $n=3$ ),代谢转化率( $n=3$ )见图 4、图 5。FGFC1 的体外代谢半衰期  $T_{1/2} = (96.25 \pm 2.3)$  min, 固有清除率  $CL_{int} = (0.0720 \pm 0.0014)$  mL/(min · mg)。

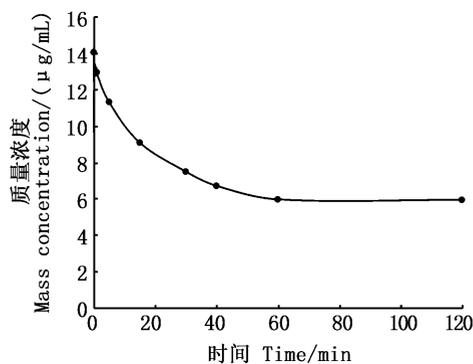


图4 FGFC1 的体外肝微粒体模型药代动力学( $n=3$ )  
Fig. 4 *In vitro* liver microsomal model pharmacokinetics of FGFC1 ( $n=3$ )

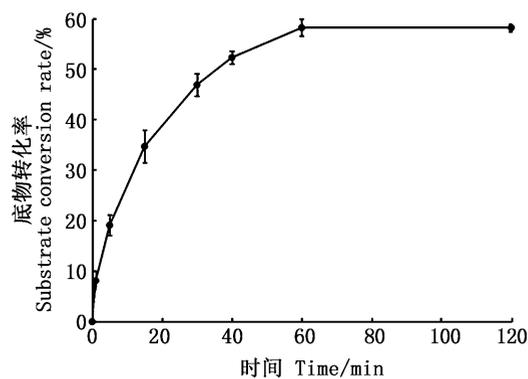


图5 FGFC1 的体外肝微粒体代谢转化率( $n=3$ )  
Fig. 5 *In vitro* liver microsomal metabolic conversion rate of FGFC1 ( $n=3$ )

按照 1.3.10 节进行高效液相分析,检测 FGFC1 转化产物产生情况,观察到 FGFC1 在代谢过程中产生一种转化产物,其 HPLC 检测结果及其浓度-时间曲线如图 6 所示。

### 2.4 肝微粒转化 FGFC1 产物的分析

利用制备型色谱按照 1.3.11 中的条件对 FGFC1 转化产物进行分离纯化,通过 LC-MS/MS 鉴定分析,结果见图 7。

在对分离纯化后的转化产物进行检测时,在保留时间 8.65 min 时检测到 PIO,其质子峰为  $463.30 [M + \text{乙腈} + H]^+$ ,其片段离子峰为  $110.90 [C_7H_8O + H^+H]^+$ 、 $215.70 [C_{13}H_{26}O_2 + H]^+$ 、 $337.00 [C_{18}H_{27}NO_5]^+$ 、 $337.00 [C_{25}H_{31}NO_2]^+$  (图 7)。

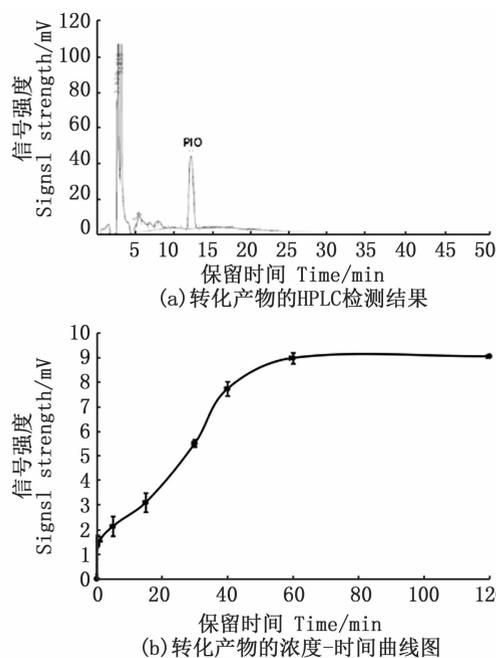


图6 转化产物的检测结果

Fig. 6 Detection results of transformed products

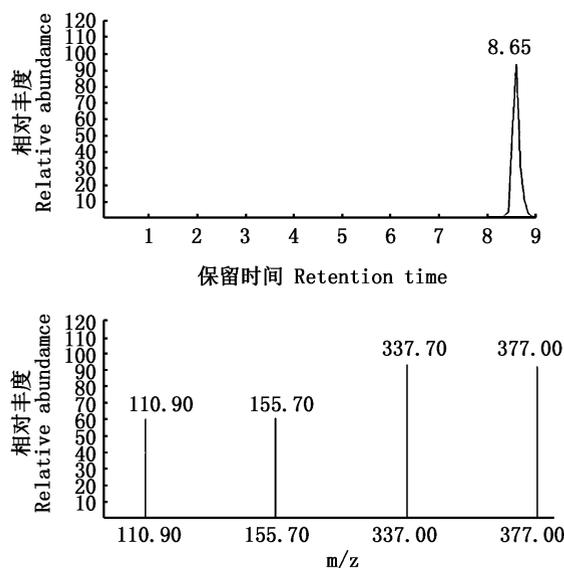


图7 FGFC1 转化产物的 LC-MS/MS 质谱图

Fig. 7 LC-MS/MS spectrum of FGFC1 conversion product

PIO 的 LC-MS/MS 检测模式为正离子模式, 基于 FGFC1 的分子结构, 从 FGFC1 分子双咪唑结构特征和肝微粒体酶系中可能发生的生物转化过程推测。FGFC1 的肝微粒体体系转化产物 PIO 在正离子检测模式中结合  $[\text{CH}_3\text{CN}]^+$  离子与  $[\text{H}]^+$  离子于质荷比 ( $m/z$ ) 463.3 处检测到其相对分子质量  $M = 421.2$ , 推测其在肝微粒体体系

中通过 N-脱烷基化反应、N-氧化反应等反应发生生物转化, 产生 PIO (图 8)。

## 2.5 FGFC1 代谢表型特性

不同 CYP450 亚型抑制因子对 FGFC1 及其转化产物 PIO 最终质量浓度的影响如图 9 所示。

对照组的 FGFC1 及 PIO 终质量浓度为  $(5.838 \pm 0.157)$ 、 $(8.992 \pm 0.086) \mu\text{g/mL}$ , CYP3A4 抑制组终质量浓度分别为  $(11.249 \pm 0.330)$ 、 $(3.617 \pm 0.108) \mu\text{g/mL}$ , 其余实验组相对于对照组无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。

在 CYP2B4、CYP2E1、CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19 进行选择抑制时, FGFC1 及 PIO 的终浓度无显著统计学差异, 而对 CYP3A4 进行选择抑制时, FGFC1 的终质量浓度及 PIO 的终质量浓度较对照组具有显著统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 故可以判断 FGFC1 在肝微粒体体系中的生物转化过程主要介由 CYP3A4 催化, 受其它亚型影响小。同时也为 2.4 中的生物转化过程推断提供了依据。

## 3 讨论

FGFC1 能通过肝微粒体体系进行药物代谢, 所建立的 HPLC 定量分析方法专属性强、标准曲线及线性范围良好, 方法准确度与精密度均符合实验要求<sup>[3]</sup>, 可以在肝微粒体体系中检测到 FGFC1 (29 min 左右出峰), 能够满足大鼠肝微粒体 I 相代谢孵育体系下定量检测需要, 并应用于 FGFC1 体外肝微粒体药代动力学研究。

FGFC1 在体外肝微粒体中发生生物转化, 在 0 ~ 15 min 时代谢速度较快, FGFC1 的体外代谢半衰期  $T_{1/2} = (96.25 \pm 2.3) \text{ min}$ , 固有清除率  $CL_{\text{int}} = (0.0720 \pm 0.0014) \text{ mL}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。生物转化过程在 120 min 时趋于饱和, FGFC1 呈现的体外药代动力学特征, 说明 FGFC1 可通过主要药物代谢器官肝脏高效代谢, 具有成药性, 可作为溶血栓候选药物进一步研究与开发。

CYP3A4 亚型催化多种生物碱类化合物的生物转化<sup>[16]</sup>, 也是催化 FGFC1 在肝微粒体体系中发生生物转化的主要酶系。FGFC1 在肝微粒体中代谢途径相对单一, 推测该药在临床上与其他 CYP3A4 抑制型药物联合使用时, 效用可能会受到影响, 对于进一步研究生物体内该药的代谢和临床合理联合用药具有重要的参考意义。

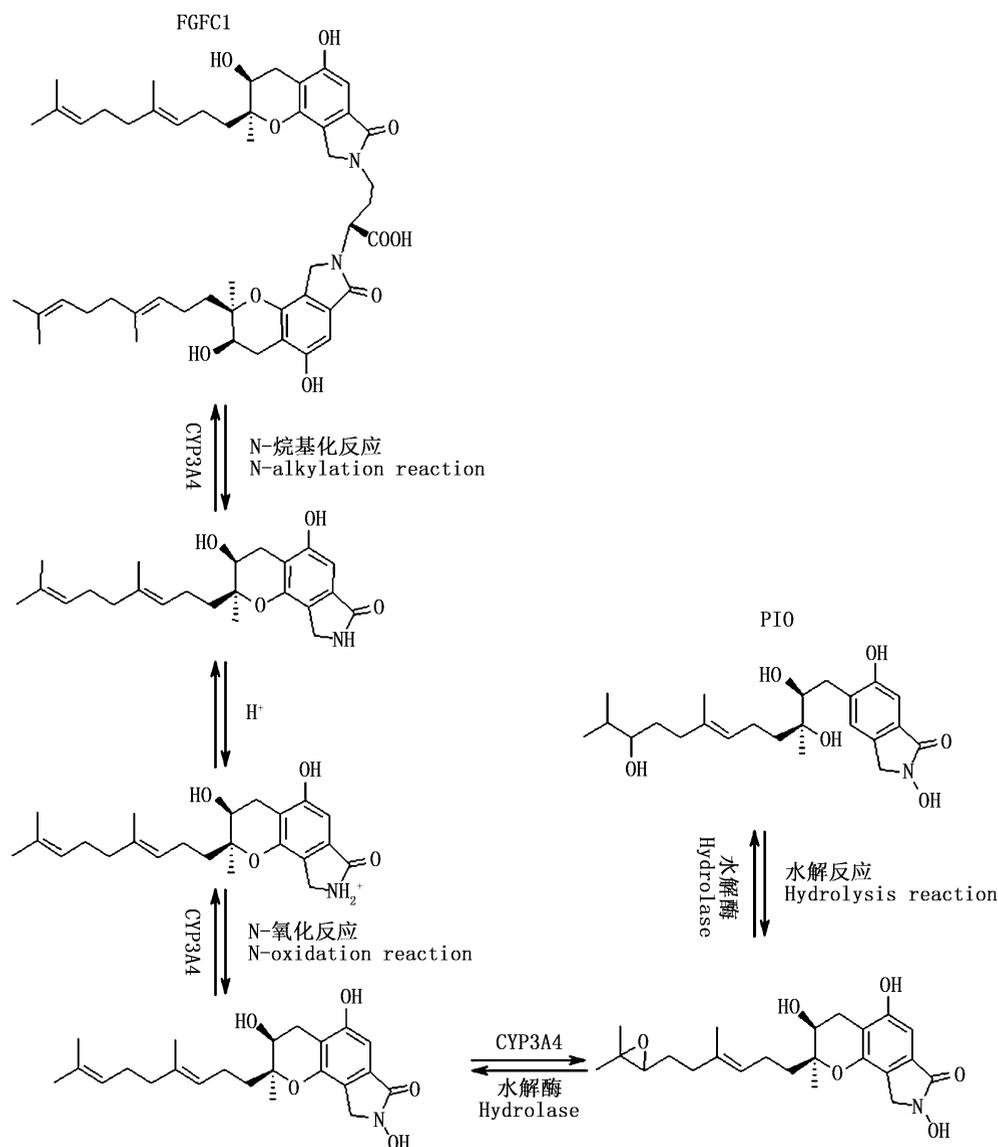


图 8 FGFC1 的肝微粒体生物转化过程示意图

Fig. 8 Schematic diagram of liver microsome biotransformation process of FGFC1

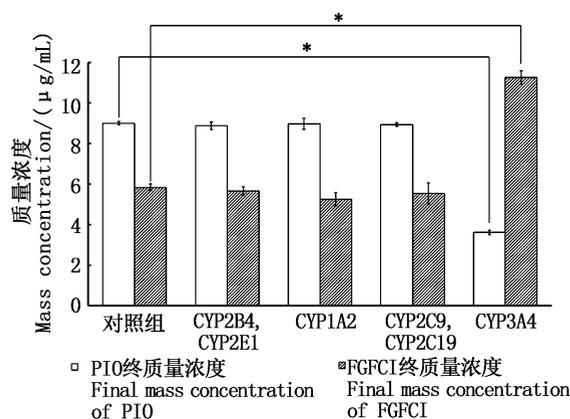


图 9 不同处理组 FGFC1 及 PIO 的终浓度

Fig. 9 Final mass concentration of FGFC1 and PIO in different treatment groups

CYP3A4 亚型催化多种生物碱类化合物的生物转化<sup>[16]</sup>,也是催化 FGFC1 在肝微粒体体系中发生生物转化的主要酶系。FGFC1 在肝微粒体中代谢途径相对单一,推测该药在临床上与其他 CYP3A4 抑制型药物联合使用时,效用可能会受到影响,对于进一步研究生物体内该药的代谢和临床合理联合用药具有重要的参考意义。

FGFC1 在肝微粒体中经 N-脱烷基化反应、N-氧化反应、水解反应发生生物转化产生一种转化产物 ((2S, 3S)-2-((E)-7, 8-dihydroxy-4-methylnon-3-en-1-yl)-3, 5, 8-trihydroxy-2-methyl-3, 4, 8, 9-tetrahydropyrano [2, 3-e] isoindol-7 (2H)-one)<sup>[18]</sup>, PIO 分子量为 421.2,不再具有双吲哚特

征结构,其是否具有纤溶活性及其完全降解需深入研究。

### 参考文献:

- [1] 王格, 严婷, 傅诗情, 等. 基于 Caco-2 细胞模型研究 FGFC1 吸收和转运的特性[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(9): 1040-1045.  
WANG G, YAN T, FU S Q, et al. Absorption and transportation characteristics of FGFC1 in Caco-2 cell monolayer[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2016, 25(9): 1040-1045.
- [2] 徐蓓蕾, 吴文惠, 朱全刚, 等. 海洋候选药物 FGFC1 冻干粉针剂处方工艺研究[J]. 上海海洋大学学报, 2016, 25(5): 775-785.  
XU B L, WU W H, ZHU Q G, et al. A study on the formulation of FGFC1 power injection [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2016, 25(5): 775-785.
- [3] 王格, 吴文惠, 王小雨, 等. 比格犬体内 FGFC1 药物代谢动力学特征及组织分布的研究[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(7): 1019-1023.  
WANG G, WU W H, WANG X Y, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of FGFC1, a novel marine fibrinolytic compound in Beagle dogs [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2015, 31(7): 1019-1023.
- [4] 傅诗情, 严婷, 吴文惠, 等. 海洋微生物代谢产物 FGFC1 的纤溶促进作用[J]. 药学服务与研究, 2015, 15(2): 99-102.  
FU S Q, YAN T, WU W H, et al. Fibrinolysis promoting activity of a novel metabolic product of marine microbe-FGFC1[J]. Pharmaceutical Care and Research, 2015, 15(2): 99-102.
- [5] 王豪, 张久旭, 李梦薇, 等. 槟榔碱不同配伍环境下在肝微粒体中的代谢研究[J]. 中医学报, 2018, 46(5): 58-61.  
WANG H, ZHANG J X, LI M W, et al. Study on arecoline metabolism in liver microsomes under different compatibility [J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2018, 46(5): 58-61.
- [6] 张慧霞, 王鑫, 刘有平, 等. 白屈菜碱在大鼠肝微粒体中代谢的酶动力学及 CYP450 酶特异性抑制剂对其代谢的影响[J]. 沈阳药科大学学报, 2015, 32(4): 276-280.  
ZHANG H X, WANG X, LIU Y P, et al. Metabolic kinetic and subtypes of CYP450 of chelidone in rat liver microsomal enzyme[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2015, 32(4): 276-280.
- [7] 沈晶晶, 张春华, 陈山乔, 等. 海藻-昆布药对对大鼠肝微粒体代谢酶的影响及肝毒性研究[J]. 药物评价研究, 2015, 38(3): 256-261.  
SHEN J J, ZHANG C H, CHEN S Q, et al. Effects of *Sargassumfusiforme-Laminaria japonica* Chinese medicine pair on cytochrome P450 *in vitro* and study on its hepatotoxicity [J]. Drug Evaluation Research, 2015, 38(3): 256-261.
- [8] 李海玲, 彭书明, 李凇, 等. 4 种常用蛋白浓度测定方法的比较[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(4): 277-278, 282.  
LI H L, PENG S M, LI L, et al. Studies on four conventional methods for protein determination [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2008, 29(4): 277-278, 282.
- [9] WANG X X, REN J, ZHU S X, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of eupatilin and its metabolite in rats by an HPLC-MS/MS method [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018, 159: 113-118.
- [10] 吴桐, 阳海鹰, 原梅, 等. 雷公藤甲素在人和大鼠肝微粒体代谢消除和酶动力学的比较研究[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(10): 1414-1419.  
WU T, YANG H Y, YUAN M, et al. Comparative study of metabolic clearance and enzymatic kinetics of triptolide in human and rat liver microsomes [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2018, 34(10): 1414-1419.
- [11] 乔混, 石蕊, 刘蔓, 等. HPLC-QTrap-MS 鉴定欧前胡素体内代谢物及肝微粒体孵化产物 [J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(15): 1352-1358.  
QIAO S, SHI R, LIU M, et al. Identification of imperatorin and its metabolites *in vitro* and *in vivo* by HPLC-QTrap-MS technology [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2017, 52(15): 1352-1358.
- [12] WANG J L, ZHENG D D, WANG Y Z, et al. Pharmacokinetics study of Erhuang decoction extracts in rats by HPLC - MS/MS [J]. Journal of Chromatography B, 2017, 1059: 35-42.
- [13] 张瑜瑜, 董文慧, 徐静静, 等. 白屈菜碱在人肝微粒体中代谢产物的鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2018, 35(6): 477-483.  
ZHANG Y Y, DONG W H, XU J J, et al. Identification of metabolites of chelidone in human liver microsomes [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2018, 35(6): 477-483.
- [14] TAN A M, FANARAS J C. How much separation for LC - MS/MS quantitative bioanalysis of drugs and metabolites [J]. Journal of Chromatography B, 2018, 1084: 23-35.
- [15] TANEJA I, KARSAULIYA K, RASHID M, et al. Species differences between rat and human *in vitro* metabolite profile, *in vivo* predicted clearance, CYP450 inhibition and CYP450 isoforms that metabolize benzantrone: Implications in risk assessment [J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 111: 94-101.
- [16] DE LEON J, ARMSTRONGS C, COZZA K L, et al. Clinical guidelines for psychiatrists for the use of pharmacogenetic testing for CYP450 2D6 and CYP450 2C19 [J]. Psychosomatics, 2006, 47(1): 75-85.
- [17] 杨岩涛, 杨岩, 王韧, 等. 鱼腥草注射液与鱼腥草素钠注射液体外肝微粒体代谢研究 [J]. 药物评价研究,

2018, 41(12): 2214-2220.

YANG Y T, YANG Y, WANG R, et al. Metabolism of Houltuyniae injection and sodium new Houltuyfonate injection in liver microsomes[J]. Drug Evaluation Research, 2018,

41(12): 2214-2220.

[18] CHADHA N, SILAKARI O. Indoles as therapeutics of interest in medicinal chemistry: Bird's eye view [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2017, 134: 159-184.

## Transformation of biindole marine alkaloid FGFC1 by hepatic microsomal system

ZHANG Benshuai<sup>1</sup>, JIANG Shengnan<sup>2</sup>, YANG Jing<sup>2</sup>, QIAN Shiyun<sup>2</sup>, MA Zibin<sup>3</sup>, GUO Ruihua<sup>1</sup>, BAO Bin<sup>1</sup>, WU Wenhui<sup>1</sup>

(1. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center for Processing and Storage of Seawater Products, Shanghai 201306, China; 3. National Freshwater Aquatic Products Processing Technology R&D Center, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** *In vitro* pharmacokinetics and transformation products of novel marine fibrinolytic compound FGFC1 were studied. Liver microsomes were prepared by Wistar rats. The liver microsomal protein concentration was detected by lowry method. The changes of FGFC1 and its transformation products were detected by HPLC method. The conversion products were analyzed by LC-MS/MS method and 4-phenyl-1,2,3-thiadiazole, deacetylcyclopropionate, phenytoin and ketoconazole are selective inhibitors of different subtypes of the CYP450 enzyme system. The *in vitro* metabolic half-life of FGFC1 was  $T_{1/2} = (96.25 \pm 2.3)$  min, and the intrinsic clearance rate  $CL_{int} = (0.0720 \pm 0.0014)$  mL/(min · mg). The conversion product of FGFC1 is ((2S, 3S)-2-((E)-7,8-dihydroxy-4-methylnon-3-en-1-yl)-3,5,8-trihydroxy-2-methyl-3,4,8,9-tetrahydropyrano[2,3-e]isoindol-7(2H)-one) (PIO) with a molecular weight of 421.2. The fragments of the FGFC1 conversion product were detected by LC-MS/MS at 463.30 [M + C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N + H]<sup>+</sup> and m/z 110.90 [C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O + H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>, 215.70 [C<sub>13</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub> + H]<sup>+</sup>, 337.00 [C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 337.00 [C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>. Phenytoin significantly inhibited the liver microsomal enzyme system CYP3A4 subtype, and the PIO was reduced with 49.11%. FGFC1 is converted by N-dealkylation reaction, N-oxidation reaction and hydrolysis reaction under the catalysis of CYP450 subtype CYP3A4.

**Key words:** liver microsomal; FGFC1; biotransformation; half-life; PIO