

银杏黄酮的体外葡醛酸反应及其药物相互作用

诸敏^{1,2}, 姚彤炜¹, 曾苏¹

(1. 浙江大学药学院 药物分析与药物代谢研究室, 浙江 杭州 310031; 2. 杭州市第二人民医院 临床药理学室, 浙江 杭州 310015)

[摘要] 目的: 获得银杏黄酮体外代谢情况, 预测银杏叶制剂与常用心血管类药物之间的代谢性相互作用的可能性。方法: 银杏黄酮与普罗帕酮、硝苯地平、地非三唑和依普黄酮在经 β -萘黄酮诱导的鼠肝微粒体中共孵育, 以HPLC法测定孵育液中剩余银杏黄酮的浓度, 观察共孵育药物对银杏黄酮葡醛酸结合反应的影响, 并计算银杏黄酮3个苷元的酶动力学参数。结果: 测得银杏黄酮槲皮素、异鼠李素和山奈酚的 $V_{\max}$ 值分别为 (60 ± 0.21) 、 (48 ± 0.02) 、 $(34 \pm 0.02) \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, K_m 值分别为 (24 ± 0.05) 、 (148 ± 0.09) 、 $(110 \pm 0.03) \mu\text{mol/L}$; 当银杏黄酮浓度一定时, 共孵育药物硝苯地平、普罗帕酮、依普黄酮和地非三唑对银杏黄酮的 IC_{50} 分别为 $54 \sim 70$ 、 $69 \sim 122$ 、 $85 \sim 98$ 和 $210 \sim 362 \mu\text{mol}$ 。测得地非三唑对银杏黄酮3种苷元的抑制常数 K_i 值分别为 57.6 、 50.5 和 33.1 mg/L ; 普罗帕酮的 K_i 值分别为 33.6 、 59.5 和 45.2 mg/L ; 依普黄酮的 K_i 值分别为 13.7 、 24.0 和 15.7 mg/L 。普罗帕酮的 $[I]/[K_i]$ 比值为 $0.002 \sim 0.003$ 。结论: 在银杏黄酮的3种苷元中槲皮素的代谢能力最强; 硝苯地平、依普黄酮和普罗帕酮等对槲皮素、异鼠李素和山奈酚的葡醛酸反应均有不同程度的抑制作用; 根据硝苯地平的 IC_{50} 值和普罗帕酮的 $[I]/[K_i]$ 值, 表明普罗帕酮与银杏黄酮之间的代谢性相互作用很弱, 而硝苯地平与银杏黄酮合用需慎重。

[关键词] 黄酮类/药代动力学; 黄酮类/代谢; 普罗帕酮/代谢; 硝苯地平/代谢; 地非三唑/代谢; 药物相互作用
[中图分类号] R 969.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2004)01-0015-06

Glucuronidation and *in vitro* interaction of Ginkgo flavonoids with other drugs

ZHU Min, YAO Tong-wei, ZENG Su (College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

[Abstract] **Objective:** To obtain the information on the glucuronidation of Ginkgo flavonoid and the interaction profile of Ginkgo flavones with other drugs *in vitro*. **Methods:** Ginkgo flavonoids (quercetin, isorhamnetin and kaempferol) and other drugs were co-incubated with rat hepatic microsome at 25°C ; the residual concentrations of flavonoids were determined by HPLC. The enzymatic parameters of quercetin, isorhamnetin and kaempferol metabolism were assessed. The interactions between flavonoids and these drugs on glucuronidation were observed. **Results:** The K_m values were (24 ± 0.05) , (148 ± 0.09) and $(110 \pm 0.03) \mu\text{mol/L}$ and the $V_{\max}$ values were (60 ± 0.21) , (48 ± 0.02) and $(34 \pm 0.02) \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ for quercetin, isorhamnetin and kaempferol, respectively. The IC_{50} of nifedipine, propafenone, ipriflavone and diphenyltriazol on flavonoids metabolism were $54 \sim 70$, $69 \sim 122$, $85 \sim 98$ and $210 \sim 362 \mu\text{mol}$, respectively. The inhibition constants (K_i) of diphenyltriazol, propafenone and ipriflavone on quercetin, isorhamnetin and kaempferol metabolism were $(57.6, 50.5, 33.1)$, $(33.6, 59.5, 45.2)$ and $(13.7, 24.0, 15.7) \mu\text{g/ml}$, respectively. The ratio $[I]/[K_i]$ of the plasma concentration and inhibition constant for propafenone was $0.002 \sim 0.003$. **Conclusion:** The metabolic level of quercetin is the strongest among three Ginkgo flavonoids. Nifedipine, propafenone and ipriflavone inhibit the metabolism of quercetin, isorhamnetin and kaempferol at different levels. Because of the interaction between Ginkgo flavonoids with nifedipine, caution must be taken when two drugs are used together clinically.

收稿日期: 2003-08-26 修回日期: 2003-11-08

基金项目: 浙江省自然科学基金(302682); 浙江省经贸委中药现代化专项基金; 杭州市卫生局课题(02A018)。

作者简介: 诸敏(1969—), 女, 硕士生, 主要从事药物代谢研究。

通讯作者: 姚彤炜(1953—), 女, 教授, 从事药物代谢与药物质量研究; E-mail: Yaotw@zjuem.zju.edu.cn

[Key words] Flavones/pharmacokin; Flavones/metab; Propafenone/metab; Nifedipine/metab; Diphenyltriazol/metab; Drug interactions

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2004,33(1):15-20.]

黄酮类化合物(flavonoids)广泛存在于植物中,具有多种生理活性,是极好的天然抗氧化剂。黄酮类化合物能清除生物体内过剩的自由基,阻止体内脂质过氧化,改善神经调节作用,提高机体的免疫力,抑制细胞凋亡,抗肿瘤,抗衰老等,其中银杏黄酮是治疗心脑血管疾病的首选的天然药物^[1,2]。银杏黄酮主要以黄酮苷(flavoneglycosides)形式存在,在体内糖苷被水解成黄酮苷元,并与葡萄糖醛酸或硫酸盐结合,这是黄酮类化合物在体内的重要代谢途径。在此代谢过程中,尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶起了重要作用。研究^[3,4]发现银杏叶提取物能够诱导细胞色素 P450(CYP)酶和增强谷胱甘肽 S-转移酶的活性;同时也发现槲皮素、山奈酚可抑制 CYP3A、1A 等酶;银杏与一些化学药品如阿司匹林、咖啡因、麦角胺、华法林、噻嗪类利尿药等有相互作用。这些研究表明,获得黄酮类化合物在体内的代谢情况及其与常用药物的相互作用对指导临床合理用药具有重要意义。

利用体外试验预报药物在体内是否发生代谢性相互作用是药物代谢的基础,是当今药代研究的热点之一^[5~7]。本实验通过银杏黄酮的 3 个苷元的体外代谢研究,来获得银杏黄酮与常用心血管类药物在药酶代谢水平上的相互作用,以预测可能的药物相互作用,为银杏制剂与其他药物合用提供科学依据,保证临床用药的安全性、合理性、有效性。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 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);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)。

槲皮素(quercetin)、异鼠李素

(isorhamnetin)和山奈酚(kaempferol)由中国药品生物制品检验所提供,桑色素(morin)为 Genay France 公司提供,尿苷二磷酸葡萄糖醛酸(UDPGA)、 β -萘黄酮(β -naphthoflavone, BNF)为 Sigma 公司产品,硝苯地平(nifedipine)由常州康普药业有限公司生产(批号 0209251),普罗帕酮(propafenone)由浙江太仓制药厂生产(批号 030110),地非三唑(DL111-IT)由浙江医药股份有限公司仙居制药厂提供,依普黄酮(ipriflavone)由浙江大学药学院药物化学研究室提供。

1.2 色谱条件 分析柱:Platinum EPS-C18 (250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m),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 ml/min;检测波长:380 nm;进样量:20 μ l。

1.3 微粒体制备 按文献^[8]方法制备。

1.4 体外孵育 参考文献^[9],取微粒体适量,加 2.25 g/L Triton X-100 溶液 50 μ l,1 mol/L Tris-HCl 溶液 50 μ l,1 mol/L MgCl₂ 溶液 10 μ l,加底物适量,用 pH 7.5 磷酸盐缓冲液稀释至 1.0 ml,混匀。微粒体蛋白质浓度为 0.5 g/L,底物终浓度为 0.05~5 g/L。在 25℃ 下预孵育 3 min,加 UDPGA 溶液 20 μ l 启动反应。孵育一定时间后加 6% HClO₄ 0.5 ml 终止反应,加入内标(0.1 g/L 桑色素甲醇溶液)20 μ l,用乙醚 2.8 ml 和丙酮 0.2 ml 的混合溶液提取,旋涡 2 min,2 000 $\times$ g 离心 10 min。取上清液挥干,加 100 μ l 流动相溶解残渣,取 20 μ l 进样,测定剩余底物浓度。

1.5 银杏黄酮的酶动力学参数测定 取 BNF 诱导的鼠肝微粒体,分别加入 2.5~250 mg/L 的槲皮素、异鼠李素和山奈酚标准品混合液各 20 μ l,按体外孵育项下方法操作。

1.6 半数抑制浓度(IC₅₀)值和表观抑制常数(K_i)值测定 固定银杏黄酮苷元(底物)浓度,与不同浓度的抗孕唑、依普黄酮、普罗帕酮和硝

苯地平进行体外共孵育,测定孵育液中黄酮苷元剩余浓度,观察这些药物对银杏黄酮苷元代谢的抑制能力,将代谢抑制百分率与各药物浓度进行线性回归,计算 IC_{50} 。

将不同浓度的底物与系列浓度的不同药物共孵育,根据底物反应速度的倒数与共孵育药物浓度进行线性回归,计算这些药物对银杏黄酮苷元代谢的 K_i 。

2 结 果

2.1 在本实验色谱条件下微粒体孵育液和共孵育药物均不干扰银杏黄酮的测定。图 1 为空白微粒体、共孵育药物及银杏黄酮孵育 120 min 后的 HPLC 图谱。

V 进行线性回归,计算 3 种黄酮苷元的酶动力学参数:米氏常数 K_m ,最大反应速度 V_{max} 和代谢清除率 Cl_{int} 值($Cl_{int}=V_{max}/K_m$),见表 1。

表 1 银杏黄酮体外代谢的酶动力学参数
Table 1 Enzymatic parameters of Ginkgo flavones metabolism *in vitro*
($\bar{x}\pm s, n=3$)

Compound	V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	Cl_{int} ($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)
Quercetin	60±0.21	24±0.05	2.50±4.20
Isorhamnetin	48±0.02	148±0.09	0.32±0.22
Kaempferol	34±0.02	110±0.03	0.31±0.67

2.3 共孵育药物对银杏黄酮体外代谢的抑制作用 固定银杏黄酮苷元(底物)浓度为 1 mg/L,与不同浓度的地非三唑、依普黄酮、普罗帕酮和硝苯地平进行体外共孵育,测定孵育液中黄酮苷元剩余浓度,观察这些药物对银杏黄酮苷元代谢的抑制能力,将代谢抑制百分率与各药物浓度进行线性回归,计算 IC_{50} ,见表 2。

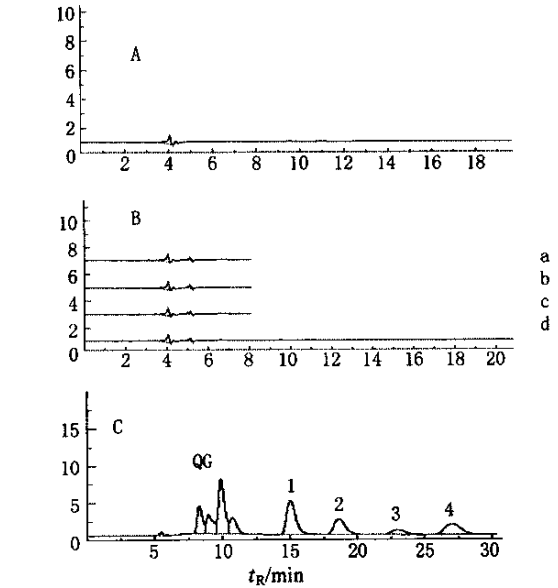


图 1 鼠肝微粒体中银杏黄酮的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC chromatograms of Ginkgo flavones in rat hepatic microsome

A. rat hepatic microsome; B. inhibitors in rat hepatic microsome; C. Ginkgo flavones incubated for 120 min with inhibitor in rat hepatic microsome
Peaks: a. nifedipine; b. propafenone; c. diphenyltriazol; d. ipriflavone
1. internal standard; 2. quercetin; 3. isorhamnetin; 4. kaempferol; QG. metabolites of flavones

2.2 酶动力学参数 根据 Lineweaver-Burk 方程式: $1/V = K_m / (V_{max} \times [S]) + 1/V_{max}$, 以底物浓度的倒数 $1/[S]$ 对反应速度的倒数 $1/V$

表 2 地非三唑、依普黄酮、普罗帕酮和硝苯地平对银杏黄酮代谢的抑制作用
Table 2 The inhibition of diphenyltriazol, ipriflavone, propafenone and nifedipine on the metabolism of quercetin, isorhamnetin and kaempferol

Substrate	$IC_{50}(\mu\text{mol})$			
	diphenyltriazol	ipriflavone	propafenone	nifedipine
Quercetin	362.0	85.35	69.8	54.9
Isorhamnetin	210.4	97.14	102.1	69.4
Kaempferol	294.6	91.07	121.1	61.3

地非三唑、依普黄酮和普罗帕酮对银杏黄酮代谢的抑制作用采用 Dixon 图(图 2~图 4)表示,利用底物反应速度的倒数与抑制剂浓度进行线性回归,求出 K_i 值。

由图 2~图 4 计算得地非三唑对银杏黄酮 3 种苷元的抑制常数 K_i 值分别为 57.6、50.5 和 33.1 mg/L,普罗帕酮的 K_i 值分别为 33.6、59.5 和 45.2 mg/L,依普黄酮的 K_i 值分别为 13.7、24.0 和 15.7 mg/L。

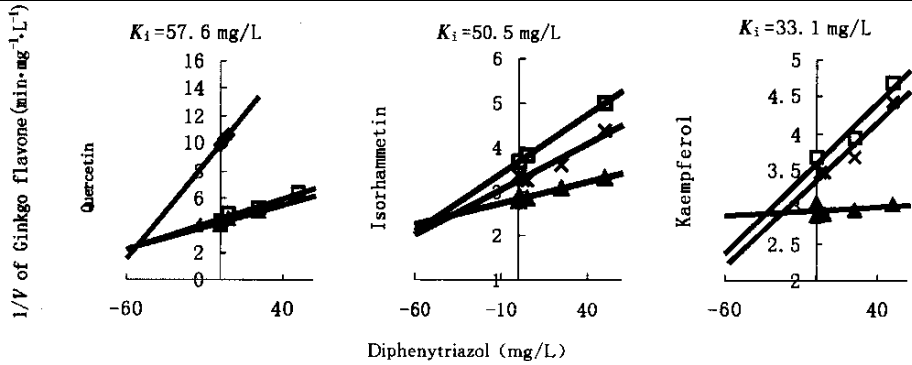


图 2 地非三唑对银杏黄酮的抑制作用

Fig. 2 Inhibition of diphenyltriazol on Ginkgo flavone

The concentration of Ginkgo flavone: ◆0.4 mg/L; □0.8 mg/L; ×1 mg/L; ▲1.2 mg/L

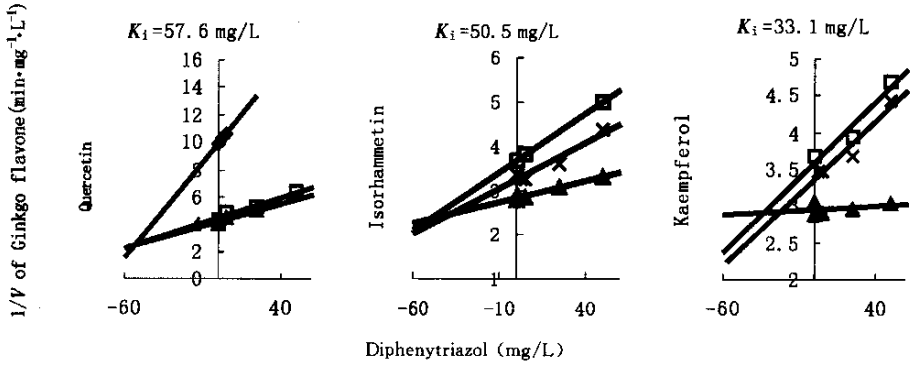


图 3 依普黄酮对银杏黄酮的抑制作用

Fig. 3 Inhibition of ipriflavone on Ginkgo flavone

The concentration of Ginkgo flavone: ×1 mg/L; ○2 mg/L; △4 mg/L

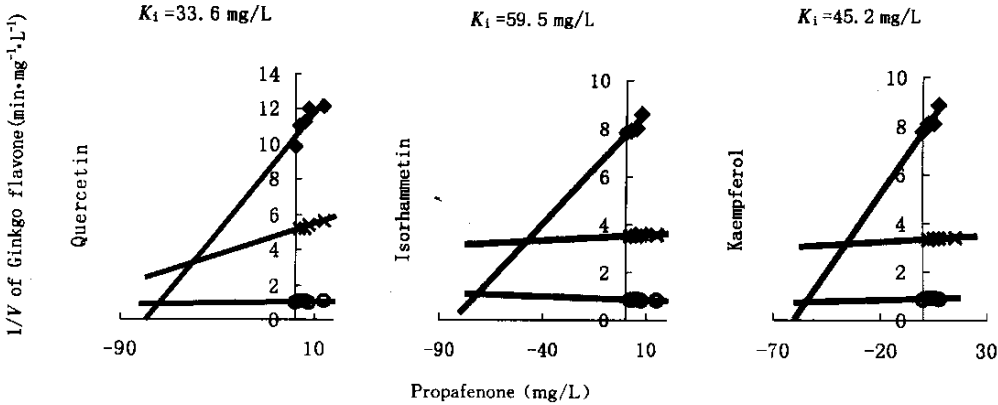


图 4 普罗帕酮对银杏黄酮的抑制作用

Fig. 4 Inhibition of propafenone on Ginkgo flavone

The concentration of Ginkgo flavone: ◆0.4 mg/L; ×1 mg/L; ○2 mg/L

实验中还发现当银杏黄酮浓度改变时,硝苯地平对其代谢的抑制能力发生变化,底物浓度增加,抑制作用增强,当底物浓度增加 1 倍时, IC_{50} 降低为 52.31、41.04 和 35.26 μmol , 显

示反竞争抑制作用。

3 讨 论

一些慢性疾病如心脑血管疾病、消化系统疾病、老年性骨质疏松等,患者常需长期服药,而在此期间又可能因其他疾病或疗效原因,需要同时服用多种药物,这就大大提高了药物相互作用的可能性。为避免药物不良反应的发生,保证患者安全、合理、有效地用药,对合用药物体内相互作用的风险程度进行预测是很有必要的。本实验选择心血管类常用药物硝苯地平 and 普罗帕酮,老年性骨质疏松治疗药依普黄酮^[10],抗早孕候选新药地非三唑作为与银杏黄酮代谢性相互作用的研究对象。根据文献报道,普罗帕酮、硝苯地平和依普黄酮的Ⅱ相代谢产物主要为葡醛酸结合物^[11~13],而银杏黄酮在体内的代谢主要为葡醛酸结合反应^[14]。本实验室研究发现,地非三唑对药物代谢酶细胞色素 P450^[15]和山奈酚的体外葡醛酸结合反应^[9]均有诱导作用,因此当这些化学药物与银杏叶制剂合用时,有可能通过竞争代谢酶或影响药酶的活性而发生药-药相互作用。

在体外代谢性药物相互作用研究中, IC_{50} 和 K_i 是两个重要的参数,测定 IC_{50} 值可初步了解药物对酶的抑制能力,一般认为 IC_{50} 值 $< 1 \mu\text{mol}$,则表明药物对该酶有强的抑制能力,而 $IC_{50} > 50 \mu\text{mol}$,则认为抑制作用很弱^[16]。本实验表明,硝苯地平对银杏黄酮的葡萄糖醛酸结合反应的抑制作用相对较强;依普黄酮和普罗帕酮其次;地非三唑的抑制作用最弱。曾有一女性患者(68岁),因患高血压采用口服硝苯地平及银杏叶片治疗(每日三次,每次各1片),服药后患者自诉右眼视力模糊,每次持续约15 min,经检查证明患者虹膜出血,停药银杏叶片,继续服硝苯地平,随访3个月未出现上述出血现象。这一临床现象可用本实验结果进行解释,两种合用药物竞争药酶,硝苯地平抑制了银杏黄酮的代谢,导致银杏黄酮血药浓度升高,引起虹膜出血。

根据 IC_{50} 值的大小可以进一步研究药物的 K_i ,由 K_i 值和该抑制剂浓度 $[I]$ (一般根据血浆总浓度或游离血浆浓度等估算 $[I]$ 值) 计算 $[I]/$

K_i 比值,预测药物在体内发生相互作用的风险程度。 $[I]/K_i$ 值如在 0.1~1.0 之间,体内发生相互作用的风险程度为中等;若 < 0.1 时则风险较低,相应的细胞色素 P450 代谢性相互作用体内研究可免做;若 > 1.0 时则风险较高,应进行体内研究^[17,18]。根据普罗帕酮的血药浓度 $[I]$ 为 0.113^[19],计算 $[I]/K_i$ 值,分别为 0.0034,0.0019,0.0025,这一结果表明普罗帕酮对银杏黄酮代谢的影响程度较小。

由银杏黄酮槲皮素、异鼠李素和山奈酚的 V_m 值和 K_m 值可知,槲皮素的体外葡醛酸反应能力较另两个黄酮强;硝苯地平、依普黄酮、普罗帕酮对三者的葡醛酸反应均有不同程度的抑制作用。普罗帕酮和硝苯地平同是心血管疾病治疗药物,临床上与银杏叶制剂合用的可能性较大,实验结果表明银杏叶制剂与普罗帕酮长期合用,发生体内相互作用的可能性较小,而与硝苯地平合用则需慎重。

References:

- [1] ZHU Fu, WANG Mei-hua (朱 福, 王 美 华). Application of plant flavones in therapy of cardiovascular diseases [J]. **Advances in Cardiovascular Diseases** (心血管病学进展), 2001, 22 (5): 295—297. (in Chinese)
- [2] SU Jun-feng, GUO Chang-jiang (苏俊锋, 郭长江). The antioxidation of diet flavone quercetin [J]. **Journal of Preventive Medicine of Chinese People's Liberation Army** (解放军预防医学杂志), 2001, 19(3): 229—231. (in Chinese)
- [3] YANG Xiu-fen, WANG Nai-ping, ZENG Fan-dian (杨秀芬, 王 乃 平, 曾 繁 典). Effects of the active components of some Chinese herbs on drug metabolizing enzymes [J]. **China Journal of Chinese Materia Medica** (中国中药杂志), 2002, 27(5): 325—328. (in Chinese)
- [4] CHENG Ze-neng, LI Huan-de (程泽能, 李焕德). Drug interaction related to traditional Chinese medicine [J]. **The Chinese Journal of Clinical Pharmacology** (中国临床药理学杂志), 2002, 18(1): 74—77. (in Chinese)
- [5] MOLTKE L L, GREENBLATT D J, SCHMIDER J, et al. *In vitro* approaches to predicting drug interactions in vivo [J]. **Biochem Pharmacol**, 1998, 55(2): 113—122.
- [6] CRESPI C L, STRESSER D M. Fluorometric screening

- for metabolism-based drug-drug interactions [J]. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, 2000, 44(1): 325—331.
- [7] RODRIGUES A D, WINCHELL G A, DOBRINSKA M R. Use of in vitro drug metabolism data to evaluate metabolic drug-drug interactions in man; the need for quantitative databases [J]. **J Clin Pharmacol**, 2001, 41: 368—373.
- [8] YAO Tong-Wei, HU Yun-zhen (姚彤伟, 胡云珍). RP-HPLC determination of diphenyltriazol in rat liver microsomal incubates and its application in *in vitro* metabolism [J]. **Acta Pharmaceutica Sinica** (药学报), 2002, 37(6): 458—461. (in Chinese)
- [9] GU Shao-Jun, YAO Tong-Wei, HU Jing (顾少君, 姚彤伟, 胡 静). Glucuronidation of kaempferol in ginkgo biloba flavonoid *in vitro* [J]. **Chin J Pharmacol Toxicol** (中国药理学与毒理学杂志), 2003, 17(6): 451—456. (in Chinese)
- [10] NIE Jing-jing, LU Liang-hua, SUN Jun (聂 晶, 卢良华, 孙 军). An effective drug to prevent and treat osteoporosis-Ipriflavone [J]. **The Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy** (中国现代应用药学), 2002, 19(1): 7—9. (in Chinese)
- [11] Kroemer H K, Botsch S, Heinkele G, et al. *In vitro* assessment of various cytochromes P450 and glucuronosyltransferases using the antiarrhythmic propafenone as a probe drug [J]. **Methods in Enzymology**, 1996, 272: 99—105.
- [12] THUMMEL, KENNETH E. Enzyme-catalyzed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction [J]. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 1997, 27(2-3): 99—127.
- [13] LEVAI F. HPLC method for the concentration determination of ipriflavone and its seven metabolites in human plasma [J]. **Toxicology Letters**, 1996, 88(1): 14.
- [14] OLIVEIRA E J, WATSON D G. Metabolism of quercetin and kaempferol by rat hepatocytes and the Identification of flavonoid glycosides in human plasma [J]. **Xenobiotica**, 2002, 32(4): 279—287.
- [15] HU Yun-zhen, YAO Tong-wei. Induction of diphenyltriazol on cytochrome P4501A [J]. **Acta Pharmacologica Sinica**, 2004, in press.
- [16] CRESPI C L, STRESSER D M. Fluorometric screening for metabolism-based drug-drug interactions [J]. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, 2000, 44(1): 325—331.
- [17] TUCKER G T, HOUSTON J B, HUANG S M. Optimizing drug development: strategies to assess drug metabolism/transporter interaction potential-toward a consensus [J]. **Clin Pharmacol Ther**, 2001, 70(2): 103—114.
- [18] Preclinical factors influencing the relative contributions of Phase I and II enzymes to the metabolism of the experimental anti-cancer drug 5, 6-dimethylxanthene-4- acetic acid [J]. **Biochemical Pharmacology**, 2003, 65(1): 109—120.
- [19] YU Chen, ZHANG Hui, HONG You-cai, et al (余 琛, 张 慧, 洪有采, 等). Metabolism of propafenone in arrhythmic patients [J]. **Chinese Journal of Clinical Pharmacy** (中国临床药学杂志), 1998, 7(6): 261—264. (in Chinese)

[责任编辑 黄晓花]