

本文引用:杨岩涛,杨岩,江欢英,李森,刘金玲,周晋,周逸群,贺福元.小檗碱及药根碱在大鼠肝微粒体中的代谢转化研究[J].湖南中医药大学学报,2019,39(3):326-330.

## 小檗碱及药根碱在大鼠肝微粒体中的代谢转化研究

杨岩涛<sup>1,2,3,4</sup>,杨岩<sup>1,4</sup>,江欢英<sup>1</sup>,李森<sup>1,4</sup>,刘金玲<sup>1,4</sup>,周晋<sup>1,3,4</sup>,周逸群<sup>1,3,4</sup>,贺福元<sup>1,3,4\*</sup>

(1.湖南中医药大学药学院,湖南长沙410208;2.天然药物活性物质与功能国家重点实验室,中国医学科学院北京协和医学院药物研究所,北京100050;3.中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室,湖南长沙410208;  
4.湖南中医药大学中医药超分子机理与数理特征化实验室,湖南长沙410208)

**〔摘要〕**目的 进行小檗碱和药根碱在大鼠肝微粒体中的代谢转化研究,尝试给中药有效成分的体外和体内关联研究提供一定的参考。方法 制备大鼠肝微粒体,用Bradford法测定酶活性,以此配制大鼠肝微粒体体外温孵体系,加入药物温孵,用质谱进行检测测定并比较小檗碱、药根碱代谢产物图谱。结果 检测到小檗碱经大鼠肝微粒体代谢后产物中有药根碱,药根碱经大鼠肝微粒体代谢后产物中有巴马汀,但小檗碱代谢产物中未见巴马汀。结论 小檗碱和药根碱是同母核生物碱,在肝微粒体中孵育可相互影响,但体外代谢无法简单关联体内代谢过程。

**〔关键词〕** 小檗碱;药根碱;肝微粒体;代谢转化;代谢物

**〔中图分类号〕** R393;R285.5

**〔文献标志码〕** A

**〔文章编号〕** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.03.009

### Metabolic Transformation of Berberine and Jatrorrhizine in Rat Liver Microsomes

YANG Yantao<sup>1,2,3,4</sup>, YANG Yan<sup>1,4</sup>, JIANG Huanying<sup>1</sup>, LI Sen<sup>1,4</sup>, LIU Jinling<sup>1,4</sup>, ZHOU Jin<sup>1,3,4</sup>, ZHOU Yiqun<sup>1,3,4</sup>, HE Fuyuan<sup>1,3,4\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines & Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 3. Hunan Provincial Key Laboratory of Druggability and Preparation Modification of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 4. Laboratory for Supramolecular Mechanism and Mathematic-Physics Characterization for Chinese Materia Medica, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**〔Abstract〕 Objective** To investigate the metabolic transformation of berberine and jatrorrhizine in rat liver microsomes, and to provide a reference for the *in vitro* and *in vivo* association studies of active constituents in traditional Chinese medicine (TCM). **Methods** The rat liver microsome was prepared, and the enzymatic activity was determined by Bradford method to prepare the *in vitro* incubation system of rat liver microsomes. After the incubation in the presence of berberine and jatrorrhizine, mass spectrometry was used to detect and compare the metabolites of berberine and jatrorrhizine. **Results** After the metabolic transformation in rat liver microsomes, jatrorrhizine was one of the metabolites of berberine; palmatine was one of the metabolites of jatrorrhizine, but not of berberine. **Conclusion** Berberine and jatrorrhizine are from the same parent alkaloid and they can affect each other during the incubation in liver microsomes. However, the *in vitro* metabolism cannot be associated with the *in vivo* metabolism.

**〔Keywords〕** berberine; jatrorrhizine; liver microsome; metabolic transformation; metabolite

**〔收稿日期〕** 2018-03-27

**〔基金项目〕** 天然药物活性物质与功能国家重点实验室开放课题(GTZK201607);湖南省教育厅优秀青年基金(2015B172);湖南省中医药科研基金(201494);湖南省“十二五”省级药学重点学科(1007)开放基金。

**〔作者简介〕** 杨岩涛,男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事中药药剂学、中药药理学、中药制药工程与工艺方面的教学与科研工作。

**〔通讯作者〕** \*贺福元,男,教授,博士研究生导师,E-mail:pharmsharking@163.com。

中药复方是中医治病的物质基础,通过其所包含有效成分对人体产生作用,然药物成分进入人体后在体内经过吸收、分布、代谢、排泄等环节,体内产生的代谢产物与原成分有可能共同构成其物质基础。中药成分体内代谢研究是揭示中药复方药效物质基础的重要组成部分,因此对于中药质量的评价,必须从药物成分及体内代谢产物全盘考虑,只有这样才能寻找到药物质量的代表性物质。而药物成分的体外代谢是否与体内代谢一致?中药及复方成分来源于原动植物生命体,是一个巨大的超分子体系<sup>[1]</sup>,同样,人体也是一个复杂的化学工厂,机体情况的变化必将对药物作用产生影响,因此,有必要探讨药物成分代谢体外、体内的相关性,为中药药效物质研究及中药质量标志物的确定提供帮助。

黄连 *Coptis chinensis* Franch.为常用中药,具有清热燥湿、泻火解毒之功效<sup>[2]</sup>。现代研究表明:黄连生物碱具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗心律失常、降血糖、增强免疫力及抗癌等广泛药理作用<sup>[3]</sup>。小檗碱和药根碱为黄连中生物碱的重要组成成分,近年来小檗碱在临床上已从单纯的治疗肠菌性腹泻发展到治疗糖尿病、心律失常、心力衰竭等重大疾病;药根碱具有杀菌的作用。关于小檗碱、药根碱的分离、含量测定及体内代谢等已有许多报道,熊程亿等<sup>[4]</sup>报道了用薄层法确认大鼠尾静脉注射小檗碱后尿及胆汁中各有一个明显的代谢产物,潘俊芳等<sup>[5]</sup>报道了从人口服盐酸小檗碱后的尿液中分得了3个硫酸结合型代谢产物,薛宝娟等<sup>[6]</sup>通过实验证实了吴茱萸次碱对包括小檗碱和药根碱在内的5种黄连生物碱成分均存在体外弱抑制作用,但均未探讨二者在生物体外的代谢转化。因此,本文通过建立大鼠肝微粒体体外代谢模型,探讨并初步说明黄连中的重要组分小檗碱和药根碱在大鼠肝微粒体中的代谢及转化规律。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验动物为 SPF 级 SD 大鼠,购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号为 SCXK (湘) 2011-0003。小檗碱(110713-201108,供含量测定用)、药根碱(110733-200905,供含量测定用)对照品

购自中国食品药品检定研究院。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G-6-P-DH), NADPH(辅酶 II), 葡萄糖-6-磷酸 (glucose-6-phosphate, G-6-P) 购自美国 Sigma 公司。十二烷基磺酸钠(进口分装,广州市医药公司),乙腈为色谱纯,磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、EDTA、硫酸铵等其它试剂均为分析纯,水为重蒸馏水。Waters 高效液相色谱仪, Breeze 工作站, Waters 2487 Dual Absorbance Detector; 质谱检测器为 Bruker Daltonics 公司的 esquire 6000 离子阱质谱仪。

### 1.2 色谱条件

Ultimate XB-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 A: 0.1% 的磷酸缓冲溶液, pH 3.74, 流动相 B: 0.1% 的磷酸乙腈水溶液(乙腈:水=6:4), pH 4.00, A、B 均含 0.5% 的十二烷基硫酸钠, pH 4.00; A:B 梯度洗脱程序: 0 min(80:20)→30 min(65:35)→50 min(20:80)→90 min(20:80); 流速为 0.8 mL/min; UV 检测波长 345 nm; esquire 6000 质谱, 电喷雾离子化正离子检测模式(ESI<sup>+</sup>); 柱温 40 °C。

### 1.3 供试品的制备

1.3.1 肝微粒体制备 按二次离心法制备肝微粒体<sup>[7]</sup>, 实验大鼠禁食 8 h 后取肝, 用 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7.4) 的缓冲溶液清洗, 称取质量, 捣碎组织, 然后于冰浴上用 PBS 液研成匀浆, 先用 3 000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 12 000 r/min 离心 90 min, 取沉淀, 用 PBS 加甘油配成的贮存液分散, 并用 Bradford 法测定蛋白质的含量为 8.79 mg/mL, 于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.3.2 配制孵育体系 重蒸馏水 690 μL, G-6-P (165 mmol/L) 100 μL, NADP (65 mmol/L) 100 μL, MgCl<sub>2</sub> (165 mmol/L) 100 μL, G-6-P-DH (500 U/mL) 10 μL, 每次实验前新鲜配制。

1.3.3 小檗碱、药根碱溶液的配制 精密称取小檗碱 10.04 mg, 用甲醇溶解并定容到 5 mL, 使其浓度为 2.01 mg/mL; 精密称取药根碱 10.14 mg, 用甲醇溶解并定容到 5 mL, 使其浓度为 2.03 mg/L。

1.3.4 肝微粒体孵育 取“1.3.1”项下制备好的肝微粒体分为小檗碱组(A组)、药根碱组(B组)、小檗碱+药根碱组(C组)、空白组(D组)进行实验, 每组重复 5 次, 依次向各组加入已配制的 A、B、C、D 组相

应干预溶液 50  $\mu\text{L}$ , 底物加入后,  $\text{N}_2$  挥干后加入 40  $\mu\text{L}$  的磷酸盐缓冲液 (pH7.4), 重蒸馏水 60  $\mu\text{L}$ , 大鼠肝微粒体 (8.79 mg/mL) 20  $\mu\text{L}$ , 置于 37  $^\circ\text{C}$  水浴下预孵化 5 min, 加入“1.3.2”项下配制的孵育体系 40  $\mu\text{L}$  启动反应, 在 37  $^\circ\text{C}$  水浴下孵化 120 min 后于冰水中终止反应<sup>[8]</sup>。

**1.3.5 体外代谢样品的制备** 上述“1.3.4”样品终止反应后, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 加入 1 mol/L 的 NaOH 溶液 100  $\mu\text{L}$ , 涡旋 5 min; 再加入无水乙醚 1.5 mL, 涡旋 10 min, 6 000 r/min 离心 15 min, 取上清液挥干乙醚, 检测前加入 200  $\mu\text{L}$  甲醇溶解进样。

## 2 结果与分析

### 2.1 肝微粒体体外代谢液相色谱分析

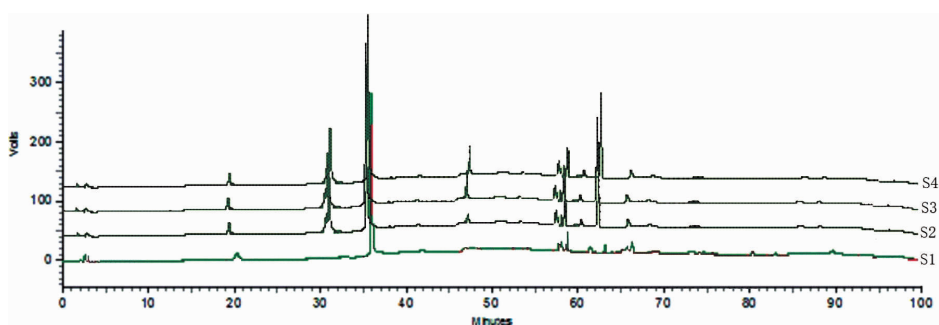
取“1.3.5”4 组肝微粒体体外代谢样品, 分别按“1.2”色谱条件进样检测, 其液相色谱图见图 1, 对比发现: 混合物组的代谢峰与小檗碱、药根碱两组代谢峰存在交叉重叠, 这符合一般代谢规律, 但却不足以阐明 3 组肝微粒体的代谢转化规律和代谢产物类

别, 为尝试分析探讨小檗碱与药根碱之间是否存在相互转化的代谢过程, 验证小檗碱与药根碱体外代谢过程是否吻合本研究团队前期所提出“网通虹势”理论中的网通性规律<sup>[9]</sup>, 进一步采用质谱检测器对小檗碱和药根碱肝微粒体体外代谢样品进行检测。

### 2.2 小檗碱与药根碱肝微粒体体外代谢质谱分析

在液相色谱分析的基础上, 进一步采用质谱检测器对肝微粒体体外代谢样品进行检测分析, 在正离子检测方式检测模式下, 得质谱图 2-3。小檗碱分子式及分子量为  $[\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_4]^+$ 、336; 药根碱分子式及分子量为  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{NO}_4$ 、338; 巴马汀分子式及分子量为  $[\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{NO}_4]^+$ 、352, 其分子结构图见图 4-6。

ESI-MS 在线检测一级质谱条件下获得的是待测物的准分子离子峰, 几乎不产生碎片离子。在正离子检测方式检测模式下, 检测发现: 小檗碱肝微粒体代谢样品质谱图中有分子离子峰  $m/z$ 336, 同正离子量相符合, 且在小檗碱肝微粒体代谢样品质谱图中也出现了分子离子峰  $m/z$ 338, 应为药根碱分子离子峰。药根碱肝微粒体代谢样品质谱图中有分子离子峰  $m/z$ 338、 $m/z$ 352,  $m/z$ 338 为药根碱分子离子峰,



注: S1 空白肝微粒体代谢图谱; S2 小檗碱体外代谢图谱; S3 药根碱体外代谢图谱; S4 小檗碱混合药根碱代谢图谱

图 1 肝微粒体体外代谢液相色谱图

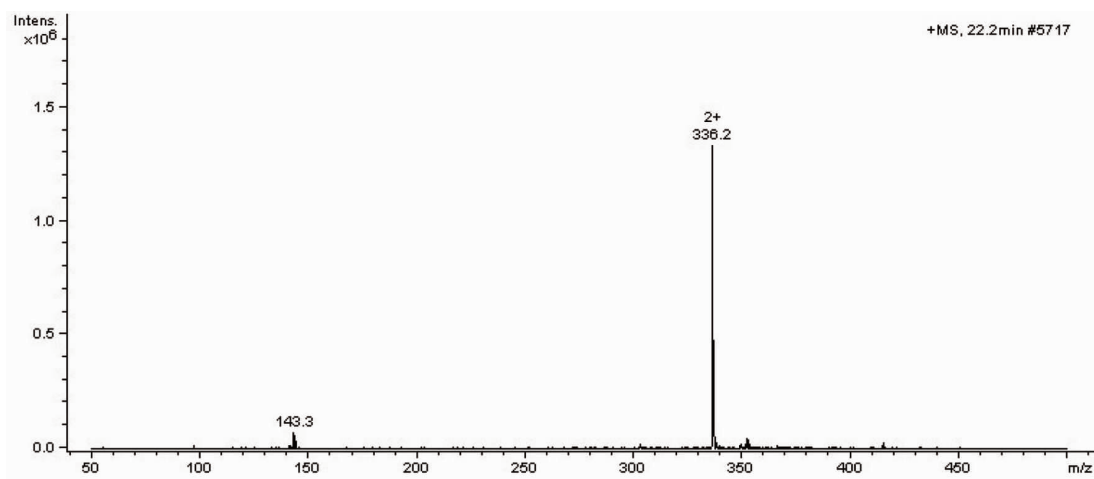


图 2 小檗碱体外代谢质谱图

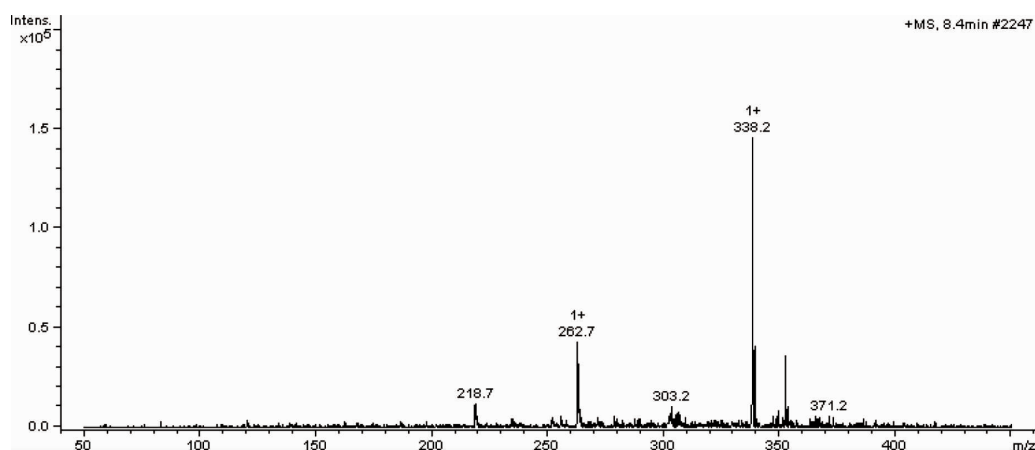


图3 药根碱体外代谢质谱图

M( $m/z$ 352) 分子离子比药根碱分子离子多 14 U, 主要二级碎片  $m/z$ 337 均比药根碱的主要二级碎片  $m/z$ 323 多 14 U 相符合, 说明 M( $m/z$ 352) 比药根碱多了 1 个甲基, 应是原药的甲基化衍合产物。由于原药分子中只有 1 个羟基, 因此是甲基化衍合的位置, 即 M( $m/z$ 352) 就是巴马汀的分子离子峰。

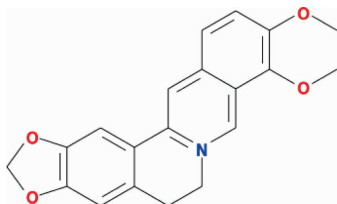


图4 小檗碱分子结构

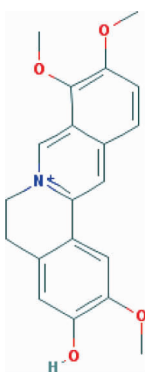


图5 药根碱分子结构

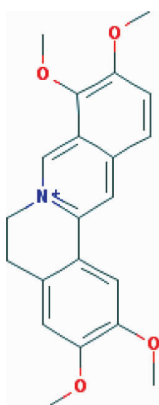


图6 巴马汀分子结构

### 2.3 与文献体内代谢对比分析

由图 2-3 可知, 在肝微粒体体外代谢过程中, 小檗碱会代谢转换为药根碱, 药根碱将代谢转换为巴马汀, 而王亮等<sup>[10]</sup>进行黄连生物碱在大鼠体内的代谢研究中发现, 小檗碱体内代谢有一部分转化为药根碱, 这与本实验的发现相一致, 而本实验亦发现了药根碱在体外代谢时部分转化为巴马汀, 但却未见药根碱体外代谢时有小檗碱的出现, 这验证了同一母核衍生物群可相互转化, 但可能由于体外代谢速度不够快, 代谢不够彻底, 从而体外代谢产物种类较少, 因此有必要探讨小檗碱及药根碱体外代谢动力学过程, 以阐明其代谢速度与代谢产物等结果。且小檗碱经灌胃后主要分布在大鼠的肺中, 其次才是肝脏, 而药根碱则主要分布在肝脏中<sup>[10]</sup>, 这也反映了不同生物碱有可能经由不同的代谢途径或由多个代谢酶主导进行代谢, 不同物质在不同脏器中会有不同的代谢过程, 因此体外代谢过程的代谢途径、代谢动力学过程等均无法简单等效或推测体内代谢过程。至于不同物质体内外代谢相关性如何, 则需要针对性的展开研究。并且小檗碱与药根碱为同母核生物碱, 均是异喹啉类生物碱的衍生物, 这符合同一母核的有效成分衍生物群的代谢过程可以相互抑制、加速及转化, 其代谢网络相容相通的“网通性”理论<sup>[9]</sup>。邱峰等<sup>[11]</sup>已经从人口服盐酸小檗碱后尿液中分离并鉴定了 7 个代谢产物, 其中 4 个为新发现的代谢产物。韩凤梅等<sup>[12]</sup>已利用液相色谱-串联电喷雾离子阱质谱法鉴定大鼠尿液中药根碱有 7 种代谢物, 朱志勇<sup>[13]</sup>给大鼠灌胃小檗碱后, 从大鼠的尿液中发现了大量的转化产物(次生代谢产物), 而本实验中体

外代谢产物种类明显较少。

### 3 讨论

本研究侧重于阐述小檗碱与药根碱体外代谢过程的网通性规律,因此对其肝微粒体中代谢产物的类别并未完整地进行分析阐明,而主要关注了同一母核衍生物群在肝微粒体代谢过程中能否相互转化。研究结果表明同母核生物碱的小檗碱和药根碱,在肝微粒体中孵化可相互影响,但体外代谢无法简单与体内代谢过程相关联,因此本研究存在有一定的局限性,需要进一步深入探讨。实验结果亦表明中药同一母核多衍生物成分有可能在体内产生相似的代谢产物与药效,单一成分可代谢转变为多种代谢产物,原成分及代谢成分可能呈相似的动力学模型,同一母核的有效成分衍生物群在人体内可以相互抑制、加速及转化,符合同一母核的有效成分衍生物群代谢网络相容相通的“网通性”理论,因此,在进行中药质量控制及评价时不能单纯着眼于中药成分,可将中药网络代谢与系统生物学的代谢组学结合,研究有效成分群代谢规律,揭示生物体之间的网络代谢普遍规律,有望揭示中药作用的物质基础;有效成分及代谢物种类、构成比及动力学规律,为确定中药质量标志物<sup>[14]</sup>提供支撑。

综上所述,中药成分在体内、体外代谢过程中均存在“网通性”代谢规律,但体内外环境条件的差异以及不同物质可能经由不同的代谢途径进行代谢或者主导代谢的酶不同,这些原因都造成药物体外代谢过程与体内代谢存在显著的差异,需要系统地开展中药成分代谢动力学及代谢途径的研究,并进一步关联其体内外代谢过程,以完整阐明其体内外代谢规律。

### 参考文献

- [1] 杨岩涛,陶叶琴,唐闻汉,等.中药控缓释制剂多成分整体受控的超分子机制探讨[J].中国中药杂志,2016,41(24):4675-4679.
- [2] 中华人民共和国药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部.北京:中国医药科技出版社,2015.
- [3] 崔学军.黄连及其有效成分的药理研究进展[J].中国药师,2006,9(5):469-470.
- [4] 熊程亿,施绪保,代宗顺,等.<sup>3</sup>H-小檗碱在家兔及小鼠体内的药代动力学研究[J].中国药理学通报,1989,5(5):293-296.
- [5] PAN J F, YU C, ZHU D Y, et al. Identification of three sulfate conjugate metabolites of berberine ctdofide in health volunteers' urine after oral administration[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2002, 21(1):77.
- [6] 薛宝娟,李志慧,张玉杰,等.吴茱萸次碱对5种黄连生物碱大鼠体外肝代谢的抑制作用[J].中草药,2014,45(9):1293-1296.
- [7] OMURA T, STATO R. The carbon monoxide-binding piganent of liver microsomes, evidence for its hemoprotein nature[J]. Journal of Biological Chemistry, 1964,239:2370-2378.
- [8] DILMAGHANIAN S, GERBER J G, FILLER S G, et al. Enantioselectivity of inhibition of cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) by ketoconazole: Testosterone and methadone as substrates[J]. Chirality, 2010, 16(2):79-85.
- [9] 贺福元,周宏灏,罗杰英,等.生物遗传多态性规律揭示中药材质量稳定性规律的探讨[J].中草药,2008,39(1):2-6,12.
- [10] 王亮,叶小利,李学刚,等.黄连生物碱在大鼠体内的代谢转化及分布[J].中国中药杂志,2010,35(15):2017-2020.
- [11] 邱峰,朱志勇,朴淑娟,等.人口服盐酸小檗碱后尿液中代谢产物的研究[J].中国医学研究与临床,2005,3(8):6-9.
- [12] 韩凤梅,朱明明,陈怀侠,等.液相色谱-串联电喷雾离子阱质谱法鉴定大鼠尿液中药根碱代谢物[J].药学学报,2006,41(9):846-851.
- [13] 朱志勇.小檗碱在人及大鼠体内代谢产物的研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2003.
- [14] 杨岩涛,李森,刘金玲,等.中药质量标志物与“网通虹势”代谢规律[J].中国中药杂志,2017,42(12):2420-2424.

(本文编辑 杨 瑛)