

【安全性评价】

鱼腥草注射液与新鱼腥草素钠注射液体外肝微粒体代谢研究

杨岩涛^{1, 2, 3, 4}, 杨 岩^{1, 4}, 王 韧^{1, 4}, 刘金玲^{1, 4}, 周 晋^{1, 3, 4}, 肖美凤^{1, 3, 4*}, 贺福元^{1, 3, 4*}

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 进行鱼腥草注射液与新鱼腥草素钠注射液体外肝微粒体代谢研究, 为进一步阐明中药多成分体系体内代谢规律奠定基础。方法 制备人肝微粒体, 用Bradford法测定酶活性, 配制肝微粒体体外温孵体系, 加入鱼腥草注射液与新鱼腥草素钠注射液温孵, 用气相色谱-质谱联用(GC/MS)法测定并比较鱼腥草注射液及新鱼腥草素钠注射液代谢样品图谱。结果 检测到鱼腥草注射液的人肝微粒代谢产物20个, 新鱼腥草素钠注射液肝微粒代谢产物24个, 鱼腥草注射液多成分体系与新鱼腥草素钠注射液单成分经肝微粒体代谢其产物的数目不完全相同, 但产物结构类型一致, 均为脂肪族、芳香族、萜类挥发性成分, 其中两者的代谢产物中均有己醛、 α -萜烯、桉树脑、癸酸、庚醇、2-异丙基-5-甲基-1-庚烷6种成分, 分别占代谢产物总量的15.40%和49.14%。结论 多成分代谢与单成分代谢规律有所不同, 但均呈多成分群聚集的特点, 成分之间存在与原植物相似的代谢途径, 符合中药各成分在同一网络体系相互连通、交流、传递的“网通性”规律。

关键词: 网通性; 鱼腥草注射液; 新鱼腥草素钠注射液; 肝微粒体; 代谢; 气相色谱-质谱联用(GC/MS)

中图分类号: R962.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2018)12-2214-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.12.015

Metabolism of Houttuyniae injection and sodium new Houttuynifonate injection in liver microsomes

YANG Yantao^{1, 2, 3, 4}, YANG Yan^{1, 4}, WANG Ren^{1, 4}, LIU Jinling^{1, 4}, ZHOU Jin^{1, 3, 4}, XIAO Meifeng^{1, 3, 4}, HE Fuyuan^{1, 3, 4}

1. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Changsha 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. Druggability and preparation of Chinese Medicine Key Laboratory of Hunan province, Changsha, Changsha 410208, China

4. Supramolecular Mechanism and Mathematic-Physics Characterization for Chinese Materia Medica, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Changsha 410208, China

Abstract: **Objective** Studying the metabolism of Houttuyniae and sodium new Houttuynifonate injection in liver microsomes to lay a foundation for clarifying the metabolism rule of Chinese herbal multi components system *in vivo* and Determining the Q-Marker of houttuynia. **Methods** The liver microsome was prepared and the enzymatic activity was determined by Bradford method. The *in vivo* liver microsomes incubating system was prepared, and the Houttuyniae injection and sodium new Houttuynifonate injection were incubated in the liver microsomes; the metabolic product were determined by GC-MS. **Results** Houttuynia injections incubated by

收稿日期: 2018-06-05

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资助(GTZK201607); 湖南中医药大学化学工程与技术一流学科建设项目资助; 湖南省教育厅优秀青年基金项目(2015B172); 湖南省中医药科研基金(201494); 湖南省教育厅一般项目(2015C1039); 湖南省“十二五”省级药学重点学科(1007)开放基金项目资助。

第一作者: 杨岩涛(1981—), 男, 河南太康人, 博士, 副教授, 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。Tel: (0731)88458223 E-mail: xdyt1@163.com

***通信作者:** 肖美凤, 讲师。Tel: (0731)88458232 E-mail: 29457543@qq.com

贺福元, 教授, 博士生导师。Tel: (0731)85381372 E-mail: pharmsharking@tom.com

liver microsomes had 20 metabolites, and 24 metabolites of sodium new Houttuynia injections, of which there were 6 common products. The number of products metabolized by hepatic microsomes in the multi-component system of sodium new Houttuynia injection was not exactly the same as that in the single component of Houttuynia cordata injection, but the structure types of products were the same, they were all aliphatic, aromatic and terpene volatile components. The same six metabolites of both components are hexanal, alpha-piperine, eucalyptus, decanoic acid, heptanol alcohol and 2- isopropyl -5- methyl -1- heptane, accounting for 15.40% and 49.14% of the total metabolites respectively. **Conclusion** The regulation of multicomponent metabolism is different from that of single component, but both of them have the characteristics of multicomponent group aggregation. There is a metabolic pathway similar to the original plant among components. It is in accordance with the law of "network communication" that the components of Chinese medicine are connected, exchanged and transmitted in the same network system.

Key words: network communication; Houttuynia injection; sodium new Houttuynia injection; liver microsomes; metabolism; Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS)

中药复方成分复杂,与机体作用方式多样,作为中医治病的物质基础,在进入机体后将经过吸收、分布、代谢、排泄等环节,在机体中各类酶的作用下可能产生多种多样的代谢产物,原入血成分及其代谢产物有可能共同构成其治疗的物质基础,因此,对于中药成分体内代谢过程的研究是揭示中药复方药效物质基础的重要组成部分,对于中药质量的评价,也必须从药物成分及其代谢产物全盘考虑才能找到中药复方质量的代表性物质。然而,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^[1],机体也是一个复杂的化学工厂,体内研究影响因素众多,机体情况的变化必将对药物体内过程产生影响。药物成分的体外代谢可以通过实验技术使其环境条件稳定,如能阐明药物成分体内外代谢的相关性,则可利用体外代谢数据反映体内代谢结果,降低研究难度,减少代谢过程的干扰因素,使实验结果更为准确可靠,为中药药效物质研究及中药质量标志物的确定提供一定的帮助。

鱼腥草为三白草科蕺菜属植物蕺菜 *Houttuynia cordata* Thunb. 的新鲜全草或干燥地上部分^[2]。性辛,味微寒,归肺经,具有清热解毒、消痈排脓、利尿通淋等功能,用于肺痈吐脓、痰热喘咳、热淋、热痢、痈肿疮毒等症^[3-4],是国家卫生部正式确定的“药食两用”品种之一。以鱼腥草为原料的制剂主要有鱼腥草注射液、新鱼腥草素钠氯化钠注射液、新鱼腥草素钠注射液、注射用新鱼腥草素钠、复方蒲公英注射液、鱼金注射液、炎毒清注射液复方制剂,具有良好的抗菌活性。但由于鱼腥草静脉滴注液出现免疫毒性而停止生产使用,给药品行业造成了巨大的损失。鱼腥草及新鱼腥草素钠注射剂均具有致敏原性,其中鱼腥草注射液的有效成分为挥发油,是多成分体系;而新鱼腥草素钠注射剂有效成分为

新鱼腥草素钠,为单成分体系。产生免疫毒性的物质包括了原成分与代谢产物,为了揭示其致敏性,阐明其免疫毒性机制,本研究尝试分析鱼腥草注射液及新鱼腥草素钠注射剂在体外肝微粒体中的代谢产物以认识其代谢规律,为进一步阐明中药多成分体系体内代谢规律、后续的谱毒动力学、谱毒效动力学研究及鱼腥草质量标志物^[5]的确定奠定基础。

1 材料

1.1 实验仪器

美国 Waters 公司 MICROMASS Quattro Micro API 型质谱仪,配有电喷雾离子化源(ESI),数据采集:MassLynx 4.1 软件(美国 Waters 公司)。岛津 LC-20 10CHT 高效液相色谱仪,恒温水浴箱(Heto Holten Denmark),匹配紫外检测器、荧光检测器。

1.2 药物及主要试剂

鱼腥草注射液(湖南正清制药有限公司,批号 150704,规格 2 mL/支);新鱼腥草素钠注射剂(广东永康药业有限公司,规格 2 mL:4 mg,批号 20153024);曲马多对照品(批号 171242-200302,质量分数 99.7%,购自中国食品药品检定研究院);聚山梨酯-20、聚山梨酯-60、聚山梨酯-80,均购于湖南尔康制药有限公司;卵磷脂[中国医药(集团)上海化学试剂公司,批号 20110204];PVP[中国医药(集团)上海化学试剂公司,批号 20110204]; β -环糊精(国药集团化学试剂有限公司,批号 20141112);咖啡因(137X)、1,7-二甲基黄嘌呤(17X)、香豆素、4-羟基-香豆素、甲苯磺丁脲、4-羟基甲苯磺丁脲、美芬妥因、4-羟基美芬妥因、右美沙芬、右啡烷、氯唑沙宗、6-羟基氯唑沙宗、咪达唑仑、1-羟基咪达唑仑、对乙酰氨基酚、苯巴比妥、葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH)、辅酶 II(β -NADP),均购自 Sigma 公司。乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为重蒸馏水。

2 方法

2.1 肝脏标本的收集及肝微粒体的制备

本研究经湖南中医药大学伦理委员会批准。采用的肝脏标本取自中国汉族成人个体,均为湖南中医药大学第一附属医院行肝脏手术切除的正常组织。患者无急慢性肝炎及明显肝硬化,亦未在术前两周内服用过CYP450的诱导剂或抑制剂。肝脏标本在离体1 h内置于冰生理盐水中并切成小片,以冰生理盐水漂洗后置液氮速冻,然后转入 -80°C 的冰箱中保存备用。

人肝微粒体的制备采用差速离心法^[6],所有操作均在 4°C 进行。微粒体蛋白浓度以Bradford法并用小牛血清白蛋白作标准对照测定。制备好的肝微粒体分装后于 -80°C 的冰箱中保存备用。

2.2 孵化反应

采用3份肝标本制成的肝微粒体,其中一份为空白。整个孵育体系总体积为200 mL含0.3 mg肝微粒体,孵育体系为80 mmol/L $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ (pH=7.4)的缓冲溶液反应体系,包括NADPH重生体系(3.3 mmol/L的 MgCl_2 、1.3 mmol/L的 $\beta\text{-NADP}$ 、0.05 μmol 的EDTA、3.3 mmol/L的G-6-P)和5 μL 鱼腥草注射液或新鱼腥草素钠注射液(空白组加蒸馏水),整个孵育体系在 37°C 摇动水浴中预孵化5 min,加入0.2 IU的G-6-PDH(2 μL)启动反应,于

37°C 水浴下孵育150 min后于冰水浴中终止反应。

2.3 样品处理

终止反应后,加入100 μL 曲马多(0.333 $\mu\text{g/mL}$)作为内标,用800 μL 氯仿-异丙醇(9:1)萃取,涡流混合2 min,3 000 r/min离心10 min,取700 μL 有机层用 N_2 吹干,检测前加入100 μL 甲醇溶解进样。

2.4 气相色谱-质谱联用(GC/MS)条件^[7-8]

石英毛细管柱Rtx-5ms(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm)。升温程序:初温为 60°C ,以 2°C/min 升至 140°C ,保持5 min,再以 10°C/min 升至 200°C ,保持9 min。分流比为15:1,载气为高纯He(99.999%);载气流速为1.0 mL/min;气化室温度为 250°C 。质谱条件是:离子源为EI源;离子源温度为 230°C ;四级杆温度为 150°C ;电子能量为70 eV;接口温度为 280°C ;溶剂延迟2.5 min;质量范围是40~500 m/z ,进样量为1 μL 。

3 结果

分别取3组肝微粒体代谢样品进样,得GC/MS谱图,分别列于图1。对鱼腥草注射液及新鱼腥草素钠注射液肝微粒代谢产物进行分析得:鱼腥草注射液的肝微粒样品中共测出126种产物,而新鱼腥草素钠注射液样品中共测出99种产物,空白样品测出121种产物,扣除与空白相同的产物,得鱼腥草注射液肝微粒代谢产物为20个,新鱼腥草素钠注射液肝微粒代谢产物为24个。其化学名和结构见表1、2。

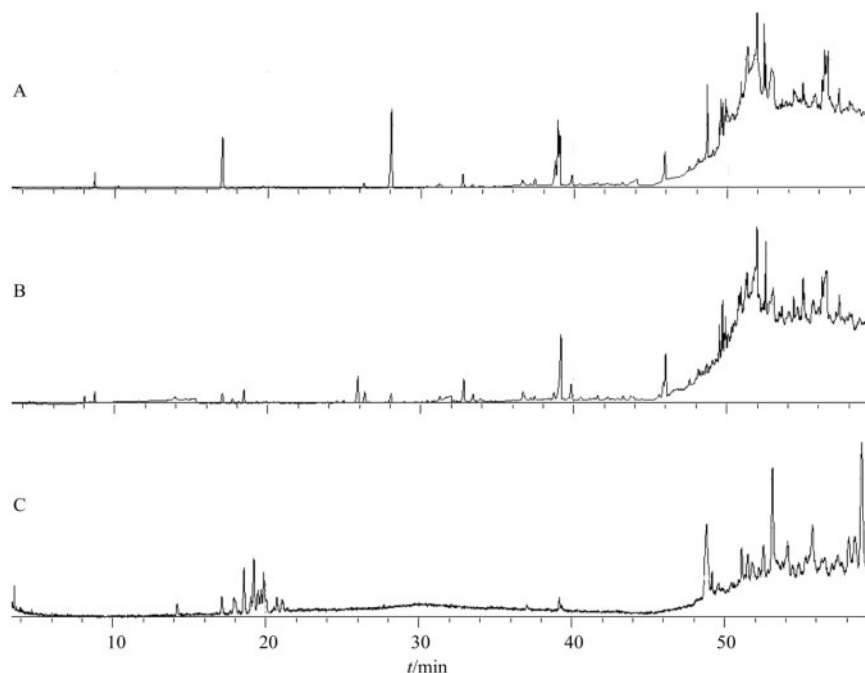
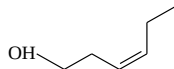
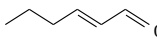
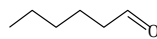
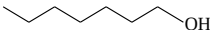
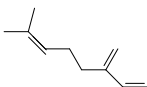
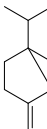
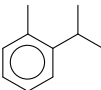
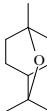
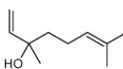
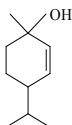
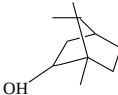
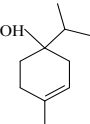
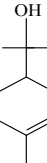


图1 新鱼腥草素钠注射液(A)、鱼腥草注射液(B)、空白(C)肝微粒体代谢产物GC/MS谱图

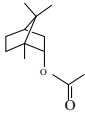
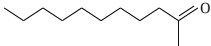
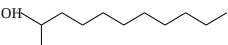
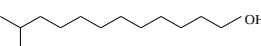
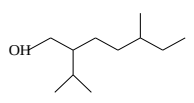
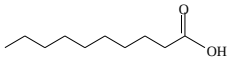
Fig. 1 GC/MS spectrum of sodium Houttuyniae injection (A), Houttuynia cordata injection (B), and blank (C) liver microsomal metabolites

表1 鱼腥草注射液肝微粒体代谢产物名称及结构

Table 1 Structure and name of liver microsomal metabolites of Houttuynia injection

编号	化合物名称	结构	保留时间/min	质量分数%
1	3-己烯-1-醇		4.353	1.295
2	2-己烯醛		4.359	0.391
3	己醛▲		3.407	2.512
4	1-庚醇▲		4.606	1.136
5	α -萜烯▲		6.461	0.659
6	β -月桂烯		8.450	0.647
7	二环[3.1.0]正己烷		7.814	11.580
8	1-甲基-2-(1-甲基乙基)-苯		9.929	0.253
9	桉树脑▲		10.250	0.496
10	3,7-二甲基-1,6-辛二烯-3-醇		13.705	2.853
11	4-异丙基-1-甲基-2-环己烯-1-醇		14.930	0.543
12	1,7,7-三甲基-双环[2.2.1]庚烷-2-醇		17.550	7.680
13	4-甲基-1-(1-甲基乙基)-环己烯-1-醇		18.270	13.120
14	3-环己烯-1-甲醇		19.100	2.282

续表1

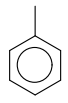
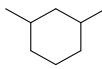
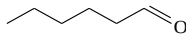
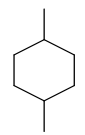
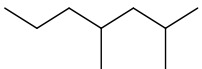
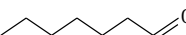
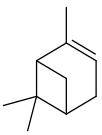
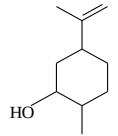
编号	化合物名称	结构	保留时间/min	质量分数/%
15	1,7,7-三甲基双环[2.2.1]乙酰乙酸酯		24.87	6.402
16	甲基壬基酮		25.69	27.750
17	甲基壬基醇		26.20	6.609
18	异十三醇		26.39	3.183
19	2-异丙基-5-甲基-1-庚烷▲		27.03	2.258
20	癸酸▲		32.13	8.343

▲: 鱼腥草注射液与新鱼腥草素钠注射剂肝微粒体代谢产物中相同成分

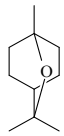
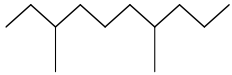
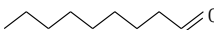
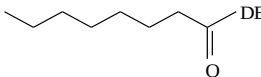
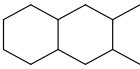
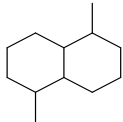
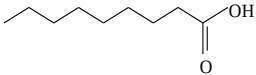
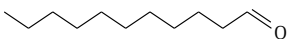
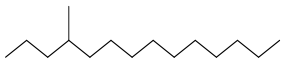
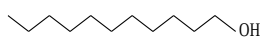
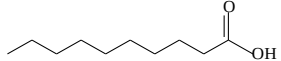
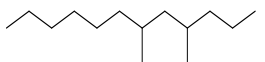
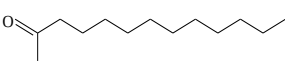
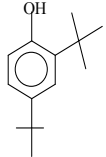
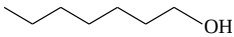
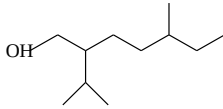
▲: same components in liver microsomal metabolites of Houttuynia injection and sodium Houttuyniae Injection

表2 新鱼腥草素钠注射剂肝微粒体代谢产物名称及结构

Table 2 Structure and name of liver microsomal metabolites of sodium new Houttuyniae Injection

编号	化合物名称	结构	保留时间/min	质量分数/%
1	甲苯		3.14	0.196
2	顺-1,3-二甲基环己烷		3.282	0.080
3	己醛▲		3.422	3.802
4	1,4-二甲基环己烷		3.671	1.103
5	2,4-二甲基庚烷		3.765	5.819
6	正庚醛		5.458	0.581
7	α-萜烯▲		6.584	1.002
8	2-甲基-5-(1-甲基乙烯基)-环己醇		10.217	0.219

续表2

编号	化合物名称	结构	保留时间/min	质量分数/%
9	桉树脑▲		10.342	0.174
10	3,7-二甲基-癸烷		11.577	0.050
11	壬醛		14.052	0.463
12	辛酸		19.054	0.780
13	2,3-二甲基-萘		19.712	1.251
14	1,5-二甲基-萘		19.983	0.291
15	壬酸		25.258	0.390
16	十一(烷)		26.685	0.253
17	4-甲基-十四烷		30.058	0.088
18	十一烷醇		31.037	0.919
19	癸酸▲		31.628	43.340
20	4,6-二甲基-十二烷		36.55	0.186
21	2-十三酮		38.864	35.660
22	1,2,4-双(1,1-二甲基乙基)苯酚		39.897	2.528
23	1-庚醇▲		40.294	0.244
24	2-异丙基-5-甲基-1-庚烷▲		40.370	0.579

▲: 鱼腥草注射液与新鱼腥草素钠注射剂肝微粒体代谢产物中相同成分

▲: same components in liver microsomal metabolites of Houttuynia injection and sodium Houttuyniae Injection

由表1、2可知,鱼腥草注射液多成分体系与新鱼腥草素钠注射剂单成分经肝微粒体代谢其产物

的数目不完全相同,但产物结构类型一致,均为脂肪族、芳香族、萜类挥发性成分,其中两者的代谢产

物中均有己醛、 α -萜烯、桉树脑、癸酸、庚醇、2-异丙基-5-甲基-1-庚烷等6种成分,分别占代谢产物总量的15.40%和49.14%,含量差异较大,多成分代谢与单成分代谢规律有所不同,中药多成分与单成分的代谢产物均呈多成分群聚集的特点,并且这些成分群与原药材成分群在代谢生源途径方面可能相同,这一现象的初步发现提示了,中药质量标志物的确定除中药复方原成分外,还应关注其代谢产物;同时对研究中药的代谢规律和免疫毒性也有着重要意义。

4 讨论

对鱼腥草注射液与新鱼腥草素钠注射剂体外人肝微粒体代谢产物的研究发现:鱼腥草注射液的人肝微粒体代谢产物20个,新鱼腥草素钠注射液肝微粒体代谢产物24个,共同产物6个,分别占代谢产物总量的15.40%和49.14%,虽然含量差异较大,但多成分体外代谢与单成分体外代谢出现代谢产物结构类型一致,且存在有共同代谢产物,反映出中药多成分与单成分的代谢产物均呈多成分群聚集的特点。成分之间存在与原植物相似的代谢途径,多成分中药的代谢规律与单成分化学药品有很大不同,单成分中药在动物体内也发生与多成分相近的代谢过程,且代谢产物与原植物成分结构类型相同,证明了中药成分在同一网络体系相互连通、交流、传递,单一成分可代谢转变为多种代谢产物,原成分及代谢成分呈相似的动力学模型,中药同一母核多衍生物成分在体内产生相似的代谢产物与药效,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,符合其代谢网络相容相通的“网通性”理论^[9]。且“网通性”规律可能普遍存在于自然界的代谢过程之中,中药多成分与单成分在体内可按“网通性”规律进行沟通,相互转化而发挥药效。这一现象的初步发现对研究中药的代谢规律和免疫毒性有重要的意义。

鱼腥草及新鱼腥草素钠注射液的“网通性”代谢规律的发现为研究其免疫毒性机制提供了基础,同时也解释了由于两者具有相似的代谢途径与产物,故呈现相似的免疫毒性。因此,由于“网通性”

现象的存在,在中药质量控制及评价研究中不能单纯着眼于中药成分,应将中药网络代谢与系统生物学的代谢组学结合。对中药药理与毒理作用研究可按中药原植物与动物体代谢途径特点,首先进行“网通性”研究,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,从而可以揭示中药作用的物质基础:有效成分及代谢物种类、构成分比及动力学规律,确定中药质量标志物^[10];再针对相关作用靶点展开进一步研究,阐明中药药性、效(毒)间的内在关系,将对中药作用机理的阐明奠定基础。

参考文献

- [1] 杨岩涛,陶叶琴,唐闻汉,等.中药控缓释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] 中国药典[S].一部.2015.
- [3] 余虹.药食两用佳品——鱼腥草[J].中国药业,2010,19(4):60-61.
- [4] 陈婧,方建国,吴方建,等.鱼腥草抗炎药理作用机制的研究进展[J].中草药,2014,45(2):284-289.
- [5] 刘昌孝,陈士林,肖小河,等.中药质量标志物(Q-Marker):中药产品质量控制的新概念[J].中草药,2016,47(9):1443-1457.
- [6] von Bahr C, Groth C G, Jansson H, et al. Drug metabolism in human liver *in vitro*: establishment of a human liver bank [J]. Clin Pharmacol Ther, 1980, 27(6): 711-725.
- [7] Zhu B, Ou-Yang D S, Chen X P, et al. Assessment of cytochrome P450 activity by a five-drug cocktail approach [J]. Clin Pharmacol Ther, 2001, 70(5): 455-461.
- [8] Di L, Kerns E H, Li S Q, et al. Comparison of cytochrome P450 inhibition assays for drug discovery using human liver microsomes with LC-MS, rhCYP450 isozymes with fluorescence, and double cocktail with LC-MS [J]. Int J Pharm, 2007, 20, 335(1-2): 1-11.
- [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] 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.