

5 种黄连生物碱大鼠体外肝代谢特征比较

李志慧, 薛宝娟, 张玉杰*, 苏瑾, 叶静, 魏宝红

北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘要: **目的** 探讨黄连中 5 种结构相似异喹啉生物碱大鼠体外肝代谢的选择性。**方法** 采用大鼠体外肝微粒体温孵方法, 通过考察温孵时间、微粒体蛋白浓度以及底物浓度对小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱和药根碱代谢的影响, 求得代谢反应动力学参数 K_m 、 V_{max} 和 CL_{int} 。**结果** 5 种黄连生物碱成分的体外肝代谢动力学参数 K_m 和 CL_{int} 间差异明显 ($P < 0.05$)。**结论** 黄连中 5 种异喹啉生物碱大鼠体外肝代谢存在显著选择性。

关键词: 黄连生物碱; 体外肝代谢; 代谢选择性; 肝线粒体; 异喹啉生物碱

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)04-0532-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.04.015

Comparison on *in vitro* hepatic metabolic characteristics of five kinds of alkaloids from *Coptis chinensis*

LI Zhi-hui, XUE Bao-juan, ZHANG Yu-jie, SU Jin, YE Jing, WEI Bao-hong

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: Objective To explore the *in vitro* hepatic metabolic selectivity of five kinds of isoquinoline alkaloids (with the similar structures) from *Coptis chinensis* in rats. **Methods** Using the method of rat *in vitro* liver microsomes incubation model, the metabolic kinetics parameters K_m , V_{max} , and CL_{int} for berberine, palmatine, coptisine, epiberberine, and jateorhizine were calculated by observing the influence of incubation time, protein concentration of liver microsomes, and substrate concentration on metabolic characteristics in liver. **Results** The difference of *in vitro* hepatic metabolic kinetics parameters K_m and CL_{int} among five kinds of alkaloids from *C. chinensis* is statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** There is a significant selectivity in *in vitro* hepatic metabolism of five kinds of isoquinoline alkaloids from *C. chinensis* in rats.

Key words: alkaloids from *Coptis chinensis*; *in vitro* hepatic metabolism; metabolic selectivity; liver mitochondria; isoquinoline alkaloids

黄连 *Coptis chinensis* Franch. 为常用中药, 具有清热燥湿、泻火解毒之功效^[1]。药理学实验表明, 黄连生物碱具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗心律失常、降血糖、抑制血小板聚集、增强免疫力及抗癌等广泛药理作用^[2]。临床常用于治疗感染性疾病、心律失常、高血压、糖尿病等。异喹啉型生物碱是黄连的主要成分, 其中量较高的为小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱和药根碱 5 种生物碱^[3]。近年来, 国内外关于黄连生物碱吸收和代谢等问题的研究日见增多^[4-5]。研究发现, 黄连生物碱之间存在代谢转化^[6]。各种黄连生物碱虽然结构相似, 但在肠道吸收方面却存在明显选择性^[7]。同样这些生物碱是否

存在其他药动环节的选择性, 目前尚未有足够试验说明。因此, 本实验试图通过体外大鼠肝微粒体温孵法考察 5 种黄连生物碱肝代谢特征, 为深入研究黄连用药机制提供依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

盐酸黄连碱和盐酸表小檗碱对照品(批号 must-12111602、must-12111601, 质量分数均 $\geq 98\%$)购自成都曼思特生物技术有限公司; 盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱对照品(批号 110713-200208、732-8701、733-8701, 质量分数均 $\geq 98\%$)购自中国食品药品检定研究院; 非那西丁、氧化型辅酶 II

收稿日期: 2013-08-04

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81073140); 北京中医药大学自主选题项目(2011JYBZZ-XS050)

作者简介: 李志慧(1988—), 女, 硕士研究生, 从事质量控制研究。Tel: (010)84738618 E-mail: hui_alassay@126.com

*通信作者 张玉杰 Tel: (010)84738618 E-mail: zhyj227@126.com

(NADP Na₂)、D-葡萄糖-6-磷酸二钠 (G-6-P) 和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G-6-PDH) 均购自北京拜耳迪物技术有限公司 (Sigma 公司分装); 牛血清白蛋白 (批号 A7906) 购自 Sigma 公司; 乙腈和甲醇为色谱纯; 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

1.2 动物

清洁级 SD 雄性大鼠, 体质量 (220±20) g, 北京维通利华实验动物中心提供。动物许可证号 SCXK (京) 2012-0001。

1.3 仪器

岛津 LC—20AT 高效液相色谱仪 (四元梯度洗脱系统, 在线真空脱气机, UV—VIS 检测器, 岛津色谱工作站); F8 型超细匀浆机 (德国 Fluko 公司); Biofuge stratos 台式高速冷冻离心机 (德国 Heraeus 公司); G—16 型高速离心机 (北京白洋离心机厂)。

2 方法与结果

2.1 HPLC 色谱条件

色谱柱为 Venusil ASB C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -30 mmol/L 乙酸铵水溶液 (B), 梯度洗脱 (0~20 min, 10%~70% A; 20~35 min, 70%~55% A; 35~36 min, 55%~90% A; 36~43 min, 90% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 °C; 检测波长 270 nm。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取各生物碱对照品适量, 加甲醇溶解制成系列不同浓度溶液 (盐酸黄连碱: 2.2~110.4 μmol/L; 盐酸表小檗碱: 2.3~115.6 μmol/L; 盐酸小檗碱: 1.8~115.2 μmol/L; 盐酸巴马汀: 2.2~120.6 μmol/L; 盐酸药根碱: 1.9~110.8 μmol/L)。

2.3 内标 (IS) 溶液的制备

精密称取非那西丁对照品适量, 加甲醇溶解配成质量浓度为 670 μg/mL 内标溶液。

2.4 NADPH-发生系统的制备

精密称取 NADPNa₂、G-6-P、G-6-PDH、MgCl₂ 适量, 加水定量溶解, 即得含 2 mmol/L NADPNa₂、20 mmol/L G-6-P、4 U/L G-6-PDH、40 mmol/L MgCl₂ 的 NADPH-发生系统。

2.5 样品溶液制备

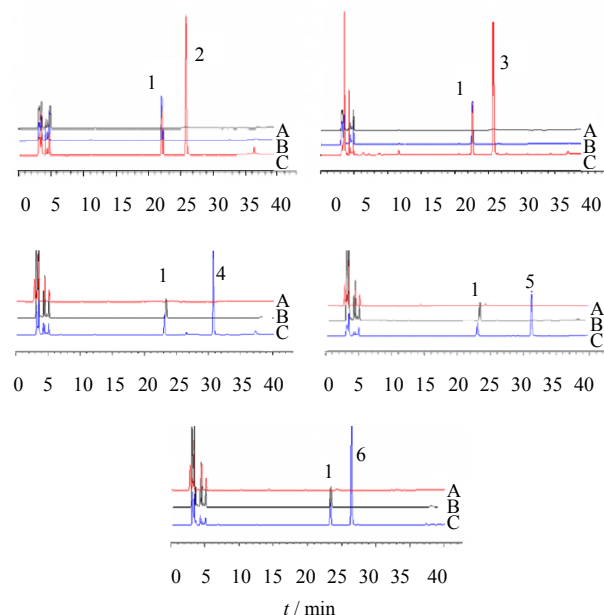
参照文献方法^[8]制备大鼠肝微粒体。分别精密吸取各黄连生物碱溶液于 PE 管中, 氮气吹干甲醇, 加入含大鼠肝微粒体 (使体系中蛋白质浓度为 1.0 mg/mL) 的 Tris 缓冲液, 于 37 °C 水浴振荡预温孵 3 min, 再加入 200 μL NADPH-发生系统起始反应,

温孵体系终体积为 0.4 mL, 使最终温孵反应体系中含有 0.5 mmol/L NADPNa₂、10 mmol/L G-6-P、1U/L G-6-PDH、10 mmol/L MgCl₂, 温孵一段时间, 立即按 1:3 的比例加入冰甲醇终止反应, 加入 7.5 μL 非那西丁溶液, 混匀, 于 4 °C、12 000×g 离心 20 min。吸取上清液, 氮气吹干, 加 400 μL 甲醇复溶, 4 °C、27 000×g 离心 20 min, 取上清进样 20 μL, 按“2.1”项下色谱条件操作进行测定。

2.6 方法学考察

按照样品溶液制备方法分别制备各生物碱样品溶液和空白溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 测得 5 种黄连生物碱 HPLC 图 (图 1)。结果, 非那西丁 (IS) 与黄连各生物碱峰形良好, 分离完全, 肝微粒体色谱图中也未见杂质峰干扰。

各生物碱在相应浓度范围内线性关系良好; 精密密度试验 RSD 0.42%~4.16%, 回收率 91.29%~110.49%; 各生物碱样品溶液室温放置 15 h 未发生明显变化, 符合生物样本测定要求。



1-非那西丁 2-黄连碱 3-表小檗碱 4-小檗碱 5-巴马汀
6-药根碱 A-空白肝微粒体 B-非那西丁 (IS)
C-非那西丁与黄连生物碱
1-phenacetin 2-coptisine 3-epiberberine 4-berberine 5-palmatine
6-jateorhizine A-blank liver microsomes B-phenacetin (IS)
C-phenacetin and alkaloids from *C. chinensis*

图 1 5 种黄连生物碱大鼠肝微粒体孵育液的 HPLC
Fig. 1 HPLC of five kinds of alkaloids from *C. chinensis*
in rat liver microsomal incubation fluid

2.7 代谢动力学试验

2.7.1 温孵时间对代谢的影响 分别精密吸取各黄连生物碱溶液（终体积为 0.4 mL，温孵体系中各生物碱的浓度均为 50 μmol/L），体系中肝微粒体蛋白质质量浓度为 1.0 mg/mL，按“2.5”项下操作，分别于温孵 0、10、30、40、50、60、80、120 min 终止反应，处理并测定后，计算各时间点温孵体系中生物碱的剩余率（ R ， $R=C_t/C_0$ ， C_0 为温孵体系中生物碱的初始浓度； C_t 为 t 时刻体系中生物碱剩余浓度），结果见图 2。

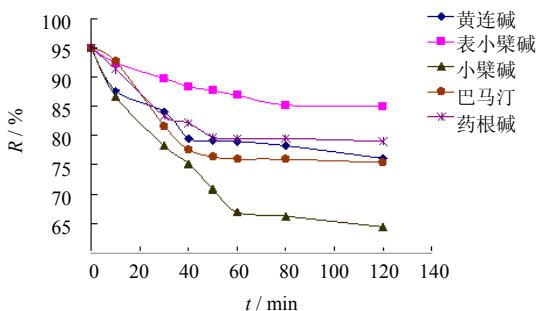


图 2 温孵时间对黄连各生物碱代谢的影响 (n=5)

Fig. 2 Effects of incubation time on metabolism of alkaloids from *C. chinensis* (n=5)

由图 2 可知，在相同的底物浓度和微粒体蛋白质质量浓度温孵条件下，各生物碱在 30~60 min 内呈时间依赖性线性消除，从而选择的最佳温孵时间均为 30 min。

2.7.2 微粒体蛋白质质量浓度对代谢的影响 分别精密吸取黄连各生物碱溶液，体系中肝微粒体蛋白质质量浓度依次为 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 mg/mL，按“2.5”项下操作。计算不同肝微粒体浓度温孵体系中各黄连生物碱的代谢速率 [V ， $V=(C_t-C_0)/(C_p \cdot t)$ ， C_0 为温孵体系中黄连各生物碱初始浓度， C_t 为 t 时刻体系中黄连各生物碱剩余浓度， C_p 为大鼠肝微粒体蛋白质质量浓度]，结果见图 3。在相同的底物浓度和温孵时间条件下，黄连各生物碱在肝微粒体蛋白质质量浓度 1.0~1.5 mg/mL 的代谢速率呈线性上升趋势，因此选择最佳肝微粒体温孵浓度为 1.0 mg/mL。

2.7.3 黄连生物碱浓度与代谢速率 分别精密吸取各黄连生物碱溶液（终体积为 0.4 mL，温孵体系中含盐酸黄连碱 2.9~76.4 μmol/L、盐酸表小檗碱 2.8~89.6 μmol/L、盐酸小檗碱 2.4~92.0 μmol/L、盐酸巴马汀 2.9~92.8 μmol/L、盐酸药根碱 2.4~76.8 μmol/L），温孵体系中大鼠肝微粒体蛋白质质量浓度均

为 1.0 mg/mL，于 37 °C 水浴振荡孵育 30 min，按“2.5”项下操作，依照“2.1”项下色谱条件测定，按“2.7.2”项下方法计算各黄连生物碱不同浓度下 V 。以各生物碱平均代谢速率 (V) - 各生物碱浓度 ($[S]$) 作图，结果见图 4。由图 4 可知，在相同的微粒体蛋白质质量浓度和温孵时间条件下，各生物碱的温孵浓度相同时，代谢速率不同；且随各生物碱浓度的增加，代谢速率呈线性增加的程度亦不同。

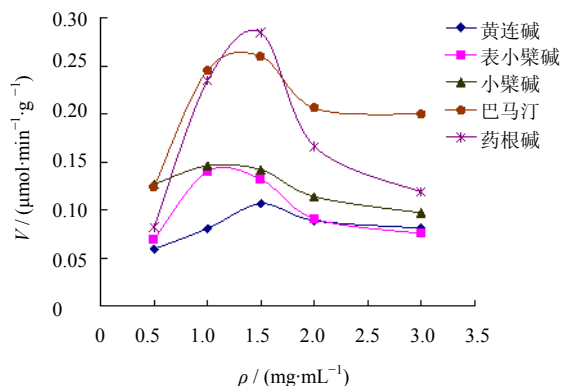


图 3 肝微粒体蛋白质质量浓度对黄连各生物碱代谢的影响 (n=5)

Fig. 3 Effects of liver microsomal protein concentration on metabolism of alkaloids from *C. chinensis* (n=5)

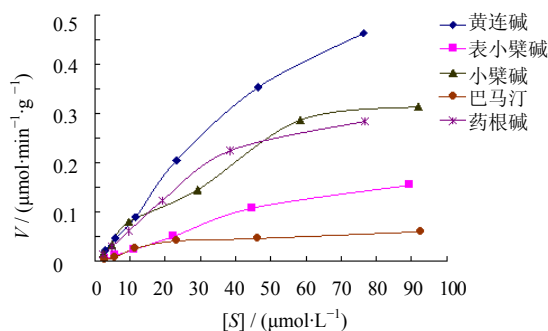


图 4 黄连生物碱浓度对代谢速率的影响 (n=5)

Fig. 4 Effects of concentration of alkaloids from *C. chinensis* on metabolic rates (n=5)

2.7.4 代谢动力学参数的计算 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法，以代谢反应速率的倒数 ($1/V$) 对黄连生物碱浓度的倒数 ($1/[S]$) 作图。求算 K_m 、 V_{max} 和 CL_{int} 等体外代谢动力学参数。

酶动力学参数结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。黄连各生物碱肝代谢动力学实验数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA)。结果见表 1。

表 1 5 种黄连生物碱的大鼠体外肝代谢动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 *In vitro* metabolic kinetic parameters of five kinds of alkaloids from *C. chinensis* in rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

生物碱	$K_m / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	$V_{\max} / (\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1})$	$CL_{\text{int}} / (\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1})$
黄连碱	$1.082 \pm 0.043^{\#\Delta\blacktriangle}$	$8.976 \pm 0.351^{\#\Delta\blacktriangle}$	$8.128 \pm 0.003^{\#\Delta\blacktriangle}$
表小檗碱	$0.611 \pm 0.003^{*\Delta\blacktriangle}$	$1.383 \pm 0.006^{*\Delta\blacktriangle}$	$2.262 \pm 0.002^{*\Delta\blacktriangle}$
小檗碱	$0.243 \pm 0.004^{*\#\Delta}$	$1.714 \pm 0.029^{*\#\Delta}$	$7.044 \pm 0.017^{*\#\Delta}$
巴马汀	$0.681 \pm 0.002^{*\#\Delta}$	$1.101 \pm 0.002^{*\#\Delta}$	$1.621 \pm 0.021^{*\#\Delta}$
药根碱	$1.244 \pm 0.051^{*\#\Delta}$	$7.694 \pm 0.320^{*\#\Delta}$	$6.183 \pm 0.022^{*\#\Delta}$

与黄连碱比较: * $P < 0.05$; 与表小檗碱比较: # $P < 0.05$; 与小檗碱比较: $\Delta P < 0.05$; 与巴马汀比较: $\blacktriangle P < 0.05$; 与药根碱比较: $\blacksquare P < 0.05$
 * $P < 0.05$ vs coptisine group; # $P < 0.05$ vs epiberberine group; $\Delta P < 0.05$ vs berberine group; $\blacktriangle P < 0.05$ vs palmatine group; $\blacksquare P < 0.05$ vs jatrorrhizine group

实验结果表明, 5 种黄连生物碱均可在大鼠肝脏中代谢, 且各生物碱代谢动力学差异具有统计学意义。 K_m 越小底物对酶的亲和力越强, 因此黄连生物碱成分对 CYP450 酶的亲和力顺序为小檗碱 > 表小檗碱 > 巴马汀 > 黄连碱 > 药根碱; 黄连生物碱成分代谢的最大反应速率不同, 顺序为黄连碱 > 药根碱 > 小檗碱 > 表小檗碱 > 巴马汀; 黄连生物碱成分体外肝代谢清除率的顺序为黄连碱 > 小檗碱 > 药根碱 > 表小檗碱 > 巴马汀。由此可知, 黄连碱的体外肝代谢速率最快, 而巴马汀体外肝代谢速率最慢。因此, 推测母核相同取代基不同是异喹啉生物碱成分体外肝代谢选择性存在的原因之一。

3 讨论

近期研究发现, 黄连碱、表小檗碱、小檗碱、巴马汀及药根碱这 5 种黄连生物碱成分在肝脏中均发生由 CYP450 酶介导的代谢反应^[9]。本实验研究亦证实, 这 5 种生物碱成分在肝微粒体中均发生代谢。本实验研究表明, 5 种黄连生物碱类成分存在体外肝代谢动力学的差异性。尽管黄连生物碱类成分的母核相同, 但由于取代基、相对分子质量大小、分子空间结构不同, 可能导致这 5 种黄连生物碱的体外肝代谢特性存在差异。此外由于本实验利用的鼠肝微粒体为 CYP450 的复合酶系, 各生物碱可能经由不同的代谢途径或由多个代谢酶主导, 相关的研究资料目前尚不充分, 因此 5 种黄连生物碱代谢方面的构效关系尚待进一步研究确认。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 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.
- [3] 彭福, 瞿显友, 钟国跃, 等. HPLC 法测定黄连不同部位中 6 个生物碱 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 509-512.
- [4] Chen Y, Wang X, Sun H, *et al.* Characterization of the transportation of berberine in *Coptidis Rhizoma* extract through rat primary cultured cortical neurons [J]. *Biomed Chromatogr*, 2008, 22(1): 28-33.
- [5] Li Y, Ren G, Wang Y X, *et al.* Bioactivities of berberine metabolites after transformation through CYP450 isoenzymes [J]. *J Transl Med*, 2011, 9: 62.
- [6] 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.
- [7] Suzuki H, Tanabe H, Mizukami H, *et al.* Selective regulation of multidrug resistance protein in vascular smooth muscle cells by the isoquinoline alkaloid coptisine [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(4): 677-682.
- [8] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [9] Han Y L, Yu H L, Li D, *et al.* *In vitro* inhibition of Huanglian [*Rhizoma coptidis* (L.)] and its six active alkaloids on six cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(11): 1660-1665.