

鱼腥草挥发油体外代谢通用客体“印迹模板”研究

周燕子^{1,2}, 王敏存^{1,2}, 贺玉婷^{1,2}, 李海英^{1,2}, 陈定芳^{1,2}, 潘雪^{1,2}, 周逸群^{1,2*}, 贺福元^{1,2,3*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

2. 中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

3. 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 基于体外代谢模型对鱼腥草 *Houttuynia cordata* 挥发油代谢产物通用客体“印迹模板”进行研究。方法 自制鱼腥草注射液 (Houttuyniae Injection, HI), 将其在大鼠肝微粒 (RLM) 中进行孵育, 于不同时间点采集样本, 进行 GC-MS 测定; 计算所有代谢产物的分子连接性指数 (MCI), 并从中筛选出代谢产物的共有成分和非共有成分, 总结其结构特点, 运用夹角余弦法计算相似度; 将所有代谢成分进行归类。结果 共得到鱼腥草挥发油代谢产物 62 个, 其中共有成分 6 个, 分别是十四烷、植烷、正癸酸、己酸、乙酸异龙脑酯和正己醇, 除乙酸异龙脑酯外, MCI 与总体代谢产物相似度较高 (0.914~0.964)。将非共有成分归类得到 6 个成分群, 其平均 MCI 与总代谢产物 MCI 的相似度均较高 (0.939~0.999), 然而各个成分群之间的平均 MCI 相似度差异显著。结论 以超分子“印迹模板”为理论指导, 为鱼腥草挥发油代谢产物进行了归类。采用分子连接性指数和夹角余弦法, 表征了鱼腥草挥发油代谢通用客体“印迹模板”。

关键词: 鱼腥草挥发油; 代谢产物; 超分子; 印迹模板; 分子连接性指数; GC-MS; 体外代谢; 通用客体; 鱼腥草注射液
中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)01-0075-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.01.010

Study on general object “imprinted template” for *in vitro* metabolism of volatile oil from *Houttuynia cordata*

ZHOU Yan-zi^{1,2}, WANG Min-cun^{1,2}, HE Yu-ting^{1,2}, LI Hai-ying^{1,2}, CHEN Ding-fang^{1,2}, PAN Xue^{1,2}, ZHOU Yi-qun^{1,2}, HE Fu-yuan^{1,2,3}

1. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Hunan Provincial Key Laboratory of Drugability and Preparation Modification of TCM, Changsha 410208, China

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

Abstract: Objective To study general object “imprinted template” of volatile oil metabolites of *Houttuynia cordata* based on *in vitro* metabolic model. **Methods** Houttuyniae Injection was incubated in rat liver microparticle (RLM). The samples were collected at different time points for GC-MS determination. The molecular connectivity index (MCI) of all metabolites was calculated. The common and non-common components of metabolites were selected, and the structural characteristics were summarized. The similarity was calculated by angle cosine method, and all metabolic components were classified. **Results** A total of 62 metabolites of volatile oil from *H. cordata* were obtained, including six components: tetradecane, *n*-decanoic acid, hexanoic acid, 2,6,10,14-tetramethylhexadecane, *D,L*-isobornyl acetate, and 1-hexanol. Except *D,L*-isobornyl acetate, MCI have high similarity with the total metabolites (0.914—0.964). The non-common components were classified into six component groups, and the average MCI was highly similar to the total metabolite MCI (0.939—0.999). However, the average MCI similarity between each component group was

收稿日期: 2020-08-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573691); 国家自然科学基金资助项目 (81874507); 国家自然科学基金青年项目 (81803729); 湖南省教育厅优秀青年项目 (20B438); 湖南省自然科学基金青年项目 (2019JJ50430)

作者简介: 周燕子, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药复方的生物有效性及其新制剂、新技术与新工艺的研究。

Tel: 18229860114 E-mail: 391963304@qq.com

*通信作者: 周逸群, 博士研究生, 讲师, 主要从事中药炮制机理、中药超分子研究。Tel: (0731)88458242 E-mail: zhouyiqun123@sina.com
贺福元, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药理学、中药药剂学、中医药超分子与数理特征化的研究。

Tel: (0731)85381372 E-mail: pharmsharking@tom.com

significantly different. **Conclusion** Under the theoretical guidance of supramolecular “imprinting template”, the metabolites of volatile oil of *H. cordata* were classified. The molecular connectivity index and angle cosine method were used to characterize the general guest “imprinted template” of volatile oil metabolism of *H. cordata*.

Key words: volatile oil of *Houttuyniae Herba*; metabolite; supramolecular; imprinted template; MCI; GC-MS; *in vitro* metabolism; general object; *Houttuyniae Injection*

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,始载于《名医别录》。作为广泛应用的传统中药,具有清热解毒、消肿疗疮、利尿除湿的功效。现代研究发现其主要化学成分为挥发油类、黄酮类、有机酸、脂肪酸、氨基酸以及生物碱类成分^[1]。其中挥发油类成分为主要药效成分,其鲜草含挥发油 0.049%,主要有鱼腥草素,即癸酰乙醛、癸醛、月桂醛及甲基正壬酮等成分^[2-6]。

临床上曾广泛应用的鱼腥草注射液(*Houttuyniae Injection*, HI)是从鲜鱼腥草中用水蒸汽蒸馏法提取的挥发油类成分^[7],加入增溶剂聚山梨酯-80及氯化钠调节为等渗溶液,滤过后灭菌而成,具有抗菌、抗病毒以及增强机体免疫力的药理作用,用于治疗上呼吸道感染、急性化脓性扁桃体炎、急性慢性支气管炎、肺炎等呼吸道疾病、尿道炎、肾盂肾炎等泌尿系统疾病以及各种皮肤感染等疾病^[8-10]。鱼腥草的有效成分为挥发油,是多成分体系^[11-13]。目前,关于鱼腥草挥发油的代谢产物鲜有报道,且没有将这些代谢产物进行归类总结。

超分子化学,即“超越分子的化学”,由 J M Lehn 提出,是分子间键的化学,涵盖由两个或两个以上化学成分缔合形成的实体的结构和功能,用于研究分子自识别、自组装等现象^[14]。中药超分子化学理论认为,中药与人体均为自然界生物超分子体,其药效基础为生物超分子“印迹模板”的聚集体,进入人体后按超分子自主印迹行为发挥药效作用^[15],代谢产物也同样适用^[16]。“印迹模板”理念起源于 Fischer 的酶与底物作用的“锁钥模型”及 Pauling 的“抗体-抗原”学说,可解释配体-受体理论,属超分子化学中主-客体化学研究范畴,具自组装、自组织、自识别与自复制的特点^[17]。“在空间结构和结合位点上能完全匹配的模板物”即为超分子“印迹模板”,对中药成分来说既是其分子结构的活性结构,也可以说是活性原子团的空间排列点阵,据此可从化学物质的本源上阐明主-客体分子自主作用的普遍规律。

因此,本实验通过自制 HI,首次研究 HI 中的

挥发油在大鼠肝微粒体的代谢产物及其特点,以超分子“印迹模板”为理论^[16,18-20],结合分子连接性指数(MCI)^[21],探索其代谢通用客体的“印迹模板”规律,对指导鱼腥草临床合理用药及其配伍具有重要意义,为中药代谢产物“印迹模板”的研究奠定基础。

1 材料

1.1 药品与试剂

新鲜鱼腥草 8 批,购于湖南中医药大学含浦校区周边村庄或菜市场,按照采购时间批次编号依次为 YXC01~YXC08,经湖南中医药大学药学院中药鉴定教研室刘塔斯教授鉴定为三白草科蕺菜属植物蕺菜 *H. cordata* Thunb.的新鲜全草。

对照品甲基正壬酮(批号 110834-200502, 0.1 mL, GC 测定质量分数 $\geq 98\%$)、正十五烷(批号 11677-200401, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、乙酸龙脑酯(批号 110759-201105, 0.2 mL, GC 测定质量分数 $\geq 97\%$)及 α -蒎烯(批号 897-2000001, 1 mg, GC 测定质量分数 $\geq 98\%$)均购自中国食品药品检定研究院;正己烷,批号 K46764991524,色谱纯,购自德国默克股份有限公司; KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、KCl、乙二胺四乙酸(EDTA)、甘油、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)、6-磷酸葡萄糖(G-6-P)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-P-DH)、 MgCl_2 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 均购自 Sigma 公司;乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯;水为超纯水。

1.2 动物

雄性 SD 大鼠,SPF 级,体质量 200~220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2011-0003。本研究依照湖南中医药大学伦理委员会的要求执行,动物实验经湖南中医药大学伦理委员会批准(伦理编号:LLBH-201107230003)。

1.3 仪器

CM-230 超纯水系统,北京帕思特科技有限公司;GCMS-QP2010 型气质联用仪,日本岛津公司;CP-114 电子天平,奥豪斯仪器上海有限公司;98-1-B 型电子控温电热套,天津市泰斯特仪器有限公司;

1000 μL 和 100 μL 移液枪, 济南好来宝医疗器材有限公司; 20 mm 球形冷凝管, 天津市奥淇洛谱商贸有限公司; 500 mL 挥发油提取器, 天长市吉高实验设备有限公司。

2 方法

2.1 HI 样品制备

取新鲜鱼腥草全株, 除去泥沙、根及烂叶, 称取 2000 g, 用剪刀剪碎成 2~3 cm 的小段, 置于单口圆底烧瓶中加水浸没药材。水蒸气蒸馏, 收集初次蒸馏液 2000 mL, 再进行重蒸馏, 收集重蒸馏液约 1000 mL, 加入 7 g 氯化钠及 5 g 聚山梨酯-80, 混匀, 加注射用水使成 1000 mL, 使用 0.45 μm 和 0.22 μm 的滤芯进行滤过, 灌封, 115 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 30 min, 即得 HI。

2.2 肝微粒体实验溶液配制

2.2.1 PBS 液配制 精密称取 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 KCl 粉末分别配制成 1 mol/L 的溶液, 并配制 EDTA 饱和溶液 (100 mmol/L), 用移液管量取 40.1 mL K_2HPO_4 溶液, 9.9 mL KH_2PO_4 溶液, 60 mL KCl 溶液, 5 mL EDTA 溶液, 加水至 500 mL, 调整 pH 值为 7.4, 即得 PBS 液。

2.2.2 G.S (800 mL) 系统溶液的配制 将 NADP、G-6-P、G-6-P-DH、 MgCl_2 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分别配制成 65 mmol/L、165 mmol/L、500 U/mL、165 mmol/L、2.6 mol/L 的溶液, 向离心管中分别加入去离子水 528 μL , G-6-P 溶液 80 μL , G-6-P-DH 溶液 32 μL , NADP 溶液 80 μL , MgCl_2 溶液 80 μL , 配制成 G.S (800 mL) 系统溶液。

2.3 大鼠肝微粒体制备

实验前大鼠控制饮食 1 周, 并于实验前禁食不禁水 24 h。将大鼠固定在木板上, 并用细线把大鼠四肢及头部固定。用剪刀将大鼠腹部打开, 快速找到肝脏; 用另一把消毒冷藏过的剪刀将肝脏整个剪下来, 不能带有除肝脏外的其它任何部分, 用冰水洗净, 称定质量。按 1:4 比例 (1 g 肝组织、4 mL PBS 液) 将肝组织研碎, 倒入 50 mL 离心管, 以 $9000\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min 后快速取上清, 再以恒温 4 $^{\circ}\text{C}$ 、 $100\,000\times g$ 离心 90 min, 取下层粉红色沉淀, 即为大鼠肝微粒体, 按照体积比 1:3 向肝微粒体中加入储存液 (750 mL PBS, 250 mL 甘油) 后, 分装于离心管中 -80°C 下保存备用。

2.4 孵化反应

向管中加入 25 μL HI (空白组加蒸馏水), 40 μL

的磷酸盐缓冲液 (pH 值 7.4), 20 μL 肝微粒体和 60 μL 双蒸馏水, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅预孵化 10 min。加入 G.S 液启动反应, 并继续在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育, 于 10、30、45、60、75、90、120、150 min 取样品。平行 3 组进行实验。

2.5 体外代谢样品的制备

在样品中加入 22.0 $\mu\text{g/mL}$ 正十五烷 (内标), 用 800 μL 氯仿-异丙醇 (9:1) 萃取, 涡旋振荡 1 min, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行 GC-MS 测定。

2.6 GC-MS 分析条件

2.6.1 气相色谱条件 色谱柱为石英毛细管柱 Rtx-5ms (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm); 升温程序: 初温为 60 $^{\circ}\text{C}$, 以 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 140 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min, 再以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 200 $^{\circ}\text{C}$, 保持 9 min; 分流比 30:1; 载气为高纯 He (99.999%); 载气流量为 1.0 mL/min; 气化室温度为 250 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.6.2 质谱条件 离子源为 EI 源; 离子源温度为 230 $^{\circ}\text{C}$; 四级杆温度为 150 $^{\circ}\text{C}$; 电子能量为 70 eV; 接口温度为 280 $^{\circ}\text{C}$; 溶剂延迟 2.5 min; 质量范围为 m/z 40~500。

3 结果

3.1 鱼腥草挥发油代谢产物信息

根据 GC-MS 结果, 只采用 2 组理想的实验数据进行展示并分析。扣除空白溶剂峰, 整理得到每个时间段各个峰的峰面积以及频数, 共得到鱼腥草挥发油代谢产物 62 个, 结果见表 1, 其中 S1、S2 来自 YXC01, S3、S4 来自 YXC02, S5、S6 来自 YXC03, S7、S8 来自 YXC04, S9、S10 来自 YXC05, S11、S12 来自 YXC06, S13、S14 来自 YXC07, S15、S16 来自 YXC08。

3.2 鱼腥草挥发油代谢共有产物

将频数 ≥ 15 (90% 批次数, 本实验批次数为 16) 的成分视为共有成分, 共得到 6 个共有成分, 按相对质量分数从高到低排序分别为十四烷 (7.15%)、植烷 (6.65%)、正癸酸 (3.10%)、己酸 (0.41%)、乙酸异龙脑酯 (0.18%)、正己醇 (0.13%), 且大都为简单直链结构, 由芳香环、酯类等复杂的结构经过肝微粒酶代谢转化而来。由表 2 可得, 共有成分的保留时间分布大致均匀。本实验只展示 MCI 零阶、一阶和二阶的值。采用夹角余弦法计算相似度, 得到共有成分的 MCI 与总代谢产物相似度普遍较高, 可以代表鱼腥草挥发油总代谢产物的“印迹模板”。乙酸异龙脑酯的相似度较低, 可能是由于乙

表1 各组鱼腥草挥发油代谢产物的峰面积及频数

Table 1 Peak area and frequency of volatile oil metabolites of *Houttuynia cordata* in each group

编号	t _R /min	峰面积														频数		
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14		S15	S16
1	4.042	0	0	0	110 409	0	0	0	0	205 874	0	0	0	0	0	0	0	2
2	4.442	190 943	82 507	438 373	1 048 818	546 398	296 325	750 568	0	178 555	251 608	461 648	202 090	162 363	310 799	191 703	162 253	15
3	4.842	0	0	39 965	133 474	0	205 558	46 314	0	0	173 139	0	247 726	194 637	256 397	150 697	115 319	10
4	5.242	56 350	0	122 044	140 556	0	38 876	130 181	0	0	0	120 852	0	0	0	0	0	6
5	5.642	0	0	0	319 473	390 514	94 632	0	759 894	401 667	0	0	123 203	289 515	0	35 083	0	8
6	6.042	0	0	0	2 337 738	0	0	95 046	3 749 445	2 091 963	0	0	0	1 818 691	0	0	0	5
7	6.442	81 080	39 256	138 002	1 737 539	619 063	126 528	126 933	0	0	55 082	125 237	119 430	0	87 348	100 432	50 485	13
8	6.842	0	0	0	291 619	0	0	0	2 550 002	1 870 886	0	0	0	1 270 083	0	0	0	4
9	7.242	0	0	330 902	0	0	0	0	0	0	0	326 214	0	0	0	0	0	2
10	7.642	93 715	0	494 812	207 004	127 965	414 950	1 822 563	0	0	512 485	373 356	610 145	0	482 178	160 832	449 773	12
11	8.042	157 499	0	1 360 793	521 726	760 116	499 925	7 245 425	504 256	375 760	946 756	1 393 687	864 434	281 503	1 199 715	433 071	688 363	15
12	8.842	41 425	0	0	1 104 438	0	4 063 399	13 714 216	0	0	0	0	10 392 261	555 168	1 969 992	370 676	676 698	9
13	9.242	0	0	0	164 235	0	69 482	0	0	0	0	0	41 149	0	0	0	0	3
14	9.642	83 762	39 037	136 520	295 046	0	105 726	0	0	0	43 322	0	0	272 894	0	0	0	7
15	10.042	224 866	157 536	1 304 480	918 738	696 851	205 991	511 027	0	0	542 401	1 164 908	106 824	0	74 283	500 811	230 239	13
16	10.442	0	0	846 930	64 788	0	160 414	151 495	0	0	43 385	213 399	1 127 418	162 672	373 965	34 802	35 691	11
17	11.242	161 026	66 719	0	0	0	0	0	512 163	0	0	0	0	0	35 023	0	0	4
18	11.642	98 894	0	0	1 886 925	0	115 157	67 775	0	0	497 747	150 669	0	905 617	131 211	0	39 009	9
19	12.042	85 341	0	0	74 856	0	40 504	82 071	0	0	0	0	96 343	0	0	65 846	66 191	7
20	12.442	34 790	0	0	207 026	0	0	41 752	0	0	0	0	676 783	0	109 454	0	0	5
21	12.842	0	0	0	35 754	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
22	13.242	60 100	0	0	67 416	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	42 850	0	3
23	13.642	1 850 287	725 891	1 791 209	996 635	385 352	929 093	716 018	0	0	1 545 776	1 508 041	105 227	0	562 849	151 029	249 023	13
24	14.842	137 623	55 908	158 078	789 182	0	286 254	397 407	0	224 914	103 240	0	120 006	0	0	0	45 519	10
25	15.642	154 991	75 772	119 333	251 287	0	0	30 097	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
26	16.042	154 623	0	133 458	906 531	0	250 387	331 948	0	0	123 981	0	109 103	0	115 200	0	46 373	9
27	16.442	0	46 884	0	1 096 027	0	279 108	226 140	530 001	0	119 287	150 952	157 910	0	139 169	0	49 977	10
28	23.642	0	0	155 755	423 101	0	450 535	152 831	0	0	242 645	491 171	0	0	59 312	0	0	7
29	24.442	727 765	365 568	1 325 917	1 140 337	0	712 537	425 310	0	265 414	252 877	659 531	912 068	0	934 100	273 440	164 834	13
30	24.842	284 785	145 030	339 559	1 215 650	273 063	691 911	440 269	299 777	0	555 573	765 151	585 586	429 313	1 106 118	333 078	114 886	15
31	25.242	0	4 374 421	0	410 562	0	160 605	201 492	0	0	0	0	505 572	0	133 601	0	31 839	7
32	25.642	13 310 934	739 967	18 565 127	520 048	7 423 618	12 346 198	9 330 912	1 893 342	2 581 057	5 567 972	5 270 122	0	0	192 422	1 825 149	2 363 500	14
33	26.042	291 568	124 545	1 057 063	19 949 594	1 404 323	3 862 517	2 515 596	0	1 088 820	2 073 542	5 500 701	7 372 767	4 750 097	9 296 845	0	0	13
34	26.442	257 603	88 481	1 180 721	1 450 229	0	139 837	93 963	0	0	0	844 023	4 834 600	2 544 519	4 234 866	1 811 151	1 090 157	12
35	26.842	51 950	49 745	129 767	4 428 204	1 093 113	322 307	0	655 883	0	0	428 752	309 296	0	70 654	191 491	0	11
36	27.242	484 654	217 520	1 100 042	10 260 601	0	327 685	0	399 642	0	0	0	226 531	0	281 479	50 723	0	9
37	27.642	868 730	6 041 852	1 502 528	4 164 026	0	287 375	125 667	1 101 990	718 504	335 362	995 072	467 749	230 075	635 689	0	44 374	14
38	28.042	0	0	0	65 473 915	893 125	25 507 514	86 734 537	0	13 783 002	1 349 827	10 580 315	78 956 932	1 872 299	3 483 440	1 294 779	3 528 993	11
39	28.442	169 166	0	791 368	20 059 613	0	0	0	369 821	0	0	0	0	377 559	179 642	0	0	6
40	28.842	248 040	0	487 371	22 087 159	0	232 584	132 295	0	0	101 327	0	1 062 084	162 209	216 251	0	57 029	10

续表 1

编号	<i>t_R</i> /min	峰面积															频数	
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15		S16
41	29.242	147 056	0	269 381	15 143 253	0	619 012	0	0	0	0	0	304 476	0	171 081	0	6	
42	29.642	823 180	257 410	2 631 450	31 385 948	0	0	0	969 690	0	71 038	189 771	712 808	197 203	85 086	0	10	
43	31.242	6 782 126	3 050 538	4 566 613	76 209 750	706 015	4 088 110	0	15 355 377	724 212	2 781 742	3 609 340	4 231 878	1 823 988	3 222 743	1 237 997	1 323 433	15
44	31.642	522 864	0	8 177 371	0	625 728	0	4 367 746	30 790 634	2 325 935	5 358 910	4 219 421	0	2 454 452	4 410 633	2 278 257	3 192 034	12
45	32.042	7 124 617	1 637 406	3 024 537	0	3 292 517	13 868 022	12 738 634	27 412 565	0	488 374	5 286 437	0	3 321 838	4 327 424	47 047	45 298	13
46	32.842	2 128 340	431 312	5 583 758	202 312 703	4 205 051	9 691 520	0	43 086 534	1 487 725	355 656	1 021 726	12 585 681	4 364 433	7 851 830	2 796 034	1 466 327	15
47	33.242	1 225 797	70 040	3 118 862	0	1 238 554	2 764 343	1 266 078	46 507 143	12 177 684	896 167	3 898 292	0	0	3 202 649	656 344	531 384	13
48	33.642	298 647	106 909	807 090	0	0	1 911 733	630 239	41 174 836	16 835 093	431 678	1 892 111	2 364 271	1 908 992	0	0	192 932	12
49	34.042	304 651	61 131	852 348	0	0	0	600 008	55 418 935	23 411 865	0	0	2 313 750	1 279 330	2 112 507	400 282	60 571	11
50	34.842	366 898	57 495	1 130 887	0	0	0	0	104 253 612	43 907 504	0	0	932 522	0	0	0	44 357	7
51	35.642	1 326 123	100 947	4 608 826	0	0	268 158	1 068 848	83 013 068	42 500 233	654 889	2 334 305	618 772	18 718 216	556 044	200 098	0	13
52	36.042	5 150 505	795 102	18 030 606	0	0	1 427 066	433 345	56 652 998	84 425 233	250 151	817 206	1 813 498	41 899 029	1 192 129	0	0	12
53	36.442	987 566	239 767	5 237 699	0	1 929 231	6 797 267	3 303 876	124 623 442	87 084 394	2 682 978	10 504 098	727 819	31 524 892	978 514	1 334 949	603 473	15
54	36.842	3 640 215	143 635	0	893 962 610	7 145 666	0	1 159 078	56 845 498	58 655 234	642 195	3 470 868	6 094 001	121 897 644	5 720 950	770 615	216 404	14
55	37.642	1 050 463	342 829	3 920 015	0	0	823 245	379 119	165 268 624	98 446 604	86 759	0	2 860 983	4 077 035	3 374 786	38 933	0	12
56	38.042	2 060 478	364 733	5 775 607	0	0	1 461 486	1 382 774	136 577 372	128 137 289	536 143	3 533 786	1 056 305	0	1 588 977	221 089	154 570	13
57	40.842	1 465 773	535 886	8 732 611	0	0	1 393 033	1 574 455	0	0	1 432 976	5 410 457	0	0	0	135 299	677 329	9
58	41.242	0	72 432	0	453 116	604 960	3 721 512	1 069 264	0	0	1 283 215	7 734 506	2 007 088	0	3 585 688	0	865 634	10
59	41.642	3 248 158	48 132	18 068 284	0	0	0	0	0	0	0	1 965 916	1 483 664	764 914	2 687 221	497 243	1 336 963	9
60	42.042	716 160	123 894	3 324 351	0	636 892	2 764 575	1 668 437	0	0	4 017 420	10 793 550	272 416	700 056	2 577 210	353 176	3 310 469	13
61	44.442	256 589	0	2 821 955	0	0	1 509 880	154 552	0	0	0	902 613	3 534 564	0	711 032	145 870	137 757	9
62	44.842	0	0	0	0	0	524 875	0	0	0	0	100 577	0	0	286 959	0	0	3

表 2 共有成分的分子式及部分 MCI

Table 2 Molecular formulas and partial MCI of common components

编号	成分	<i>t_R</i> /min	分子式	零阶	一阶	二阶	相似度
1	十四烷 (tetradecane)	32.842	C ₁₄ H ₃₀	10.485	6.914	4.536	0.924
2	植烷 (2,6,10,14-tetramethylhexadecane)	36.442	C ₂₀ H ₄₂	15.380	9.452	7.910	0.964
3	正癸酸 (<i>n</i> -decanoic acid)	31.242	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	8.012	4.988	3.265	0.930
4	己酸 (hexanoic acid)	8.042	C ₆ H ₁₂ O ₂	5.184	2.988	1.851	0.925
5	乙酸异龙脑酯 (<i>D,L</i> -isobornyl acetate)	24.842	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	10.515	5.902	6.405	0.786
6	正己醇 (1-hexanol)	4.442	C ₆ H ₁₄ O	4.983	3.023	1.784	0.914

酸异龙脑酯具有较复杂的带环立体结构，观察各个成分结构可知，大致包含烷烃、醇类、酯类、醛酮类等成分，且结构较为简单。众所周知，MCI 值与分子拓扑结构有关，分子结构的细微差异，会在 MCI 各阶出现相应的变化，这可能是导致乙酸异龙脑酯 MCI 相似度较低的原因。

3.3 鱼腥草挥发油代谢非共有成分归类

将非共有成分归类至共有成分中：以 2 个共有

成分之间频数最小的成分为界限，若其频数为单数，则划为前 1 个成分群，若为双数，则划为后 1 个成分群。共得到 6 个成分群的“印迹模板”，组成鱼腥草挥发油代谢通用客体“印迹模板”，将保留时间范围和平均 MCI 列于表 3。成分群 1 以正己醇为代表，大多为简单醇类、酯类、酮类成分；成分群 2 以己酸为代表，大多为烷烃、醇类、醛酮类和酸类成分；成分群 3 以乙酸异龙脑酯为代表，大多为烷烃、烯

表3 成分群的保留时间及平均 MCI

Table 3 Retention time and average MCI of component groups

成分群	<i>t_R</i> /min	零阶	一阶	二阶
成分群 1	3.842~7.042	6.071	3.328	2.454
成分群 2	7.042~13.042	6.954	4.158	3.133
成分群 3	13.042~29.042	9.165	5.587	4.466
成分群 4	29.042~31.442	9.770	6.202	4.291
成分群 5	31.442~35.042	10.742	6.847	5.191
成分群 6	35.442~45.042	11.584	7.360	5.510

表4 鱼腥草挥发油代谢成分群 MCI 相似度

Table 4 MCI similarity of metabolic components of volatile oil from *H. cordata*

成分群	MCI 相似度						
	成分群 1	成分群 2	成分群 3	成分群 4	成分群 5	成分群 6	总成分
成分群 1	1.000	0.946	0.975	0.832	0.977	0.867	0.969
成分群 2	0.946	1.000	0.990	0.958	0.975	0.974	0.995
成分群 3	0.975	0.990	1.000	0.927	0.989	0.951	0.999
成分群 4	0.832	0.958	0.927	1.000	0.890	0.997	0.939
成分群 5	0.977	0.975	0.989	0.890	1.000	0.922	0.988
成分群 6	0.867	0.974	0.951	0.997	0.922	1.000	0.961

却是最高 (0.999), 即各个成分群更能代表整体代谢产物的“印迹模板”。各成分群之间的相似度范围在 0.832~0.990, 其中成分群 1 与成分群 4 的相似度最低 (0.832), 说明这 2 个相互独立; 成分群 3 与 2 的相似度最高 (0.990), 说明这 2 个成分群联系紧密。可以得到, 鱼腥草挥发油代谢产物的“印迹模板”之间是相互联系又相互独立的, 它们共同组成了鱼腥草挥发油代谢通用客体的“印迹模板”。

4 讨论

本研究基于超分子化学“印迹模板”自主作用规律, 以鱼腥草挥发油体外代谢产物为主线, 研究了单成分分子连接性指数、成分群分子连接性指数、总体分子连接性指数之间的关系, 采用夹角余弦法计算相似度, 表征不同鱼腥草挥发油体外代谢产物“印迹模板”之间的特征差异, 在此基础上, 最终锁定了能够代表鱼腥草挥发油体外代谢产物“印迹模板”的成分群。

采用代谢产物逼近法, 筛选得到 16 组鱼腥草挥发油的代谢共有产物 6 个, 分别为十四烷、植烷、正癸酸、己酸、乙酸异龙脑酯、正己醇, 除乙酸异龙脑酯外, 其余成分 MCI 与总代谢产物的相似度普

烯、醇类、酮类和酯类成分; 成分群 4 以正癸酸为代表, 含烷烃和酸类成分; 成分群 5 以十四烷为代表, 主要含烷烃、烯烃成分; 成分群 6 以植烷为代表, 主要为烷烃、醇类和酸类。

3.4 鱼腥草挥发油代谢通用客体“印迹模板”研究

将 6 个代谢成分群的“印迹模板”进行相似度比较, 如表 4 所示, 各个成分群与总成分的相似度较高 (0.939~0.999), 由此可以发现, 虽然单个共有成分 (乙酸异龙脑酯) 与整体“印迹模板”的相似度较低 (0.786), 但其所在的成分群 3 的相似度

遍较高, 说明这些共有成分在总体代谢产物中极具代表性, 可能是发挥药效的潜在成分。将其它非共有成分人工划分为 6 个成分群 (“印迹模板”), 通过观察各成分群的分子结构, 可以发现每个成分群内的结构总体相似, 但各成分群之间又存在差异, 预示着各个成分群的独立性。它们与总代谢产物的 MCI 相似度均较高, 说明该划分方法的可行性, 表明这 6 个成分群可能为鱼腥草挥发油体外代谢产物“印迹模板”。此外, 各成分群之间的 MCI 相似度范围在 0.832~0.990, 说明各成分群 (“印迹模板”) 之间既是相互联系又是相互独立的, 如成分群 1 与成分群 4 的相似度最低 (0.832), 表明这两个相互独立; 成分群 3 与 2 的相似度最高 (0.990), 表明这两个成分群联系紧密。综上所述, 这 6 个成分群能够代表鱼腥草挥发油代谢通用客体的“印迹模板”。以超分子“印迹模板”为理论, 确定并划分了鱼腥草挥发油代谢成分群, 得到了鱼腥草挥发油代谢通用客体“印迹模板”。同理, 该法可用于中药体外代谢产物“印迹模板”的研究, 探索中药成分在体外代谢的规律。由于“印迹模板”是发挥生物效应的基础, 因此, 通过筛选共有成分, 锁定发挥效应的成分群 (“印迹模板”) 的个数, 有利于确

定中药成分中发挥效应的成分及成分群,为寻找中药药效成分奠定基础。然而,本实验为鱼腥草挥发油肝微粒体体外代谢实验,该法是否可用于中药体内代谢产物“印迹模板”的研究还需进一步验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chou S C, Su C R, Ku Y C, *et al.* The constituents and their bioactivities of *Houttuynia cordata* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2009, 57(11): 1227-1230.
- [2] 吴文英, 李露, 尹术华, 等. 鱼腥草挥发油提取、成分分析及应用的研究进展 [J]. 食品科技, 2020, 45(3): 224-229.
- [3] 陈清贻, 杨辉. 鱼腥草不同部位挥发油组分与抗菌活性分析 [J]. 临床合理用药杂志, 2018, 11(32): 112-114.
- [4] 黄定根, 邓雪峰, 吴雅丽, 等. 鱼腥草挥发油对去卵巢小鼠骨质疏松的预防作用及机制研究 [J]. 中南药学, 2019, 17(1): 25-29.
- [5] 王邦源, 杨艳芳, 庞建梅, 等. GC法同时测定鱼腥草提取物中9种挥发油成分的含量 [J]. 中国药师, 2019, 22(7): 1261-1264.
- [6] 肖美凤, 张雨恬, 杨岩涛, 等. 基于鱼腥草挥发性成分动态性的中药制剂“印迹模板”一致性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(14): 150-155.
- [7] 郝利军, 梁爱华, 宋经元. 鱼腥草注射液原料药材资源与质量控制研究进展 [J]. 世界中医药, 2020, 15(5): 657-662.
- [8] Sekita Y, Murakami K, Yumoto H, *et al.* Preventive effects of *Houttuynia cordata* extract for oral infectious diseases [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 2581876.
- [9] 王亚南, 祁岳, 李彦玉. 鱼腥草注射液辅助抗生素治疗胸外科术后肺部感染的临床价值 [J]. 河北北方学院学报: 自然科学版, 2019, 35(4): 42-43.
- [10] 于立婷, 金毅, 杨莉萍, 等. 鱼腥草抗炎药理作用的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(17): 1935-1938.
- [11] 吴文英, 尹术华, 李露, 等. 鱼腥草挥发油对多柔比星致大鼠心肌损伤的保护机制 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(14): 302-310.
- [12] 张延智, 刘佳乐, 缪菊连, 等. 鱼腥草地下部分挥发油成分的GC-MS分析 [J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(14): 25-27.
- [13] 罗秋水, 谢升, 汤凯洁, 等. 鱼腥草挥发油抗氧化作用的研究 [J]. 中国粮油学报, 2020, 35(2): 105-109.
- [14] Lehn J M. Supramolecular chemistry - Scope and perspectives: Molecules - supermolecules - molecular devices [J]. *J Incl Phenom*, 1988, 6(4): 351-396.
- [15] 贺福元, 周逸群, 邓凯文, 等. 超分子化学对中医药理论的特殊影响 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(8): 1534-1543.
- [16] 陶叶琴. 金(山)银花超分子客体“印迹模板”特征及其代谢研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2017.
- [17] Lehn J M. Supramolecular chemistry: Where from? Where to? [J]. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(9): 2378-2379.
- [18] 贺福元, 邓凯文, 潘雪, 等. 基于中医药超分子“气析”理论探讨抗新型冠状病毒药物的研究策略 [J]. 中草药, 2020, 51(3): 557-562.
- [19] 潘雪, 樊启猛, 余格, 等. 基于超分子“印迹模板”特性的中药质量标志物研究模式的思考 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4569-4575.
- [20] 周逸群, 李瑞, 贺玉婷, 等. 中药“炒炭存性”炮制共性技术的研究现状及超分子“印迹模板”表征技术的提出 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(19): 4293-4299.
- [21] 李海英, 樊启猛, 贺玉婷, 等. 金银花、山银花动态挥发性成分的质量控制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(22): 148-155.

[责任编辑 郑礼胜]