·基础研究·

黄连水提液中木兰花碱和木兰花碱单体代谢动力学差异△

薛宝娟[1,2]，汪祺[3a]，闫天月[1]，王雪[1]，荆紫琪[1]，张玉杰[1*]，马双成[3*]

1. 北京中医药大学 中药学院，北京　102488；

2. 国家中医药管理局 监测统计中心，北京　100027；

3. 中国食品药品检定研究院，北京　100050

［摘要］ **目的：**探讨黄连水提液中木兰花碱和木兰花碱单体代谢动力学差异。**方法：**采用大鼠体外肠渗透液-肝微粒体温孵联动模型，考察木兰花碱体外肝微粒体代谢动力学特性，并采用高效液相色谱-线性离子阱/静电场轨道阱高分辨质谱法（HPLC-LTQ/Orbitrap MS）对木兰花碱代谢产物进行定性鉴别，分析木兰花碱代谢途径，考察木兰花碱与黄连中其他成分代谢性相互作用。**结果：**黄连水提液中木兰花碱的米氏常数 [K_m，（0. 53±0. 16）μmol·L^{-1}] 低于木兰花碱单体 [（0. 85±0. 12）μmol·L^{-1}，P<0. 05]，表明黄连水提液中木兰花碱对大鼠肝微粒体的亲和性大于木兰花碱单体；黄连水提液组最大反应速度（V_{max}）、肝固有清除率（CL_{int}）及肝清除率（CL）均低于木兰花碱单体组（P<0. 05），黄连水提液组半衰期（$T_{1/2}$，44. 22 min）较木兰花碱组（37. 35 min）延长（P<0. 01），表明黄连水提液中木兰花碱在大鼠肝微粒中代谢和消除速率变慢，$T_{1/2}$更长。木兰花碱与黄连水取液中木兰花碱的代谢产物存在差别。木兰花碱检出代谢产物 5 个，黄连水提液中检出木兰花碱的代谢产物 8 个。木兰花碱代谢途径主要为羟基化、去甲基化、脱氢、酮基化、葡萄糖化和葡萄糖醛酸化。黄连水提液中木兰花碱一羟基化代谢产物及一脱甲基化代谢产物在肝微粒体中可进一步发生羟基化代谢。**结论：**木兰花碱在肠道和肝微粒体中均可产生代谢。黄连中其他成分可降低木兰花碱在大鼠肝微粒体中的代谢速率，增加其代谢产物的数量。

［关键词］ 木兰花碱；黄连；高效液相色谱-线性离子阱/静电场轨道阱高分辨质谱法；肠-肝代谢；代谢动力学；代谢产物；相互作用

［中图分类号］ R285　［文献标识码］ A　［文章编号］ 1673-4890(2023)01-0073-10

doi：10. 13313/j. issn. 1673-4890. 20220803002

Differences of Metabolic Kinetics Between Monomeric Magnoflorine and Magnoflorine in Coptidis Rhizoma Water Extract

XUE Bao-juan[1,2], WANG Qi[3a], YAN Tian-yue[1], WANG Xue[1], JING Zi-qi[1], ZHANG Yu-jie[1*], MA Shuang-cheng[3*]

1. *School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 102488, *China*;

2. *Monitoring and Statistical Research Center*, *National Administration of Traditional Chinese Medicine*, *Beijing* 100027, *China*;

3. *National Institutes for Food and Drug Control*, *Beijing* 100050, *China*

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the differences in metabolic kinetics between monomeric magnoflorine and magnoflorine in Coptidis Rhizoma water extract. **Methods**: The linkage rat model of "intestinal penetrating fluid-liver microsome incubation" *in vitro* was adopted to study the metabolic kinetic characteristics of magnoflorine *in vitro* liver microsome and to identify the metabolites by high performance liquid chromatography-linear ion trap/electrostatic field

△［基金项目］ 国家自然科学基金项目（81673680）

*［通信作者］ 张玉杰，教授，博士生导师，研究方向：中药药动学；E-mail：zhyj227@126.com

马双成，研究员，研究方向：中药民族药物质基础研究与质量安全评价；Tel：010-53852072，E-mail：msc@nifdc.org.cn

[a] 并列第一作者

orbitrap high resolution mass spectrometry (HPLC-LTQ/Orbitrap MS). The metabolic pathways of magnoflorine were analyzed, and the interaction between magnoflorine and coexisting components in Coptidis Rhizoma was investigated. **Results**: The Michaelis constant [K_m, (0.53±0.16) μmol·L^{-1}] of magnoflorine in Coptidis Rhizoma water extract was lower than that [(0.85±0.12) μmol·L^{-1}] of magnoflorine monomer (P<0.05), which indicated that the affinity of magnoflorine in Coptidis Rhizoma water extract in the rat liver microsome was higher than that of magnoflorine monomer. The maximum reaction velocity (V_{max}), hepatic intrinsic clearance (CL_{int}), and hepatic clearance (CL) of magnoflorine in Coptidis Rhizoma water extract were lower than those of magnoflorine monomer (P<0.05), and the half-time ($T_{1/2}$) of magnoflorine in Coptidis Rhizoma water extract (44.22 min) was higher than that (37.35 min) of magnoflorine monomer (P<0.01), suggesting that the metabolism and elimination rates of magnoflorine in Coptidis Rhizoma water extract in the rat liver microsome were slower, and the half-life period was longer. The results indicated that monomeric magnoflorine and magnoflorine in Coptidis Rhizoma water extract had different metabolites. Five metabolites were found in monomeric magnoflorine, while eight metabolites were found in magnoflorine in Coptidis Rhizoma water extract. The pathways to these metabolites were hydroxylation, demethylation, dehydrogenation, ketonization, glucosylation, and glucuronidation. Mono-hydroxylation and mono-demethylation metabolites of magnoflorine in Coptidis Rhizoma water extract in the intestinal penetrating fluid could be further metabolized in the rat liver microsome. **Conclusion**: Magnoflorine can metabolize in both intestinal tract and liver microsomes. Coexisting components in Coptidis Rhizoma reduce the metabolic rate of magnoflorine in the rat liver microsome and increase the number of its metabolites.

[**Keywords**] magnoflorine; Coptidis Rhizoma; HPLC-LTQ/Orbitrap MS; enterohepatic metabolism; metabolic kinetics; metabolites; interaction

黄连为临床常用中药，其中生物碱类为其最主要的药效成分[1-3]。生物碱主要为苄基异喹啉类，包括原小檗碱型和阿朴啡型，前者研究较多，后者近年来也逐渐受到关注[3]。木兰花碱是黄连中重要的阿朴啡型生物碱[4]，具有抗肿瘤、抑菌、降糖、抗氧化、免疫调节等广泛的生物活性[5-8]。本课题组前期药动学研究表明，黄连中其他成分可显著降低木兰花碱的吸收和消除速率[9]，但木兰花碱与黄连中其他成分相互作用具体存在于吸收、分布、代谢和排泄哪个环节尚不清楚。药物代谢是药动学研究的重要环节，关系着药物的治疗效果、药效维持时间及不良反应等。药物经过代谢可能使其活性丧失或者生成具有毒性的代谢产物，将直接影响药物的有效性与安全性[10]。肝脏含有丰富的药物代谢酶系统，是药物代谢和生物转化的主要器官，因此探讨药物在肝脏中的稳定性及代谢情况尤为重要[11]。

本研究采用肠渗透液-肝微粒体温孵联动模型，将木兰花碱及黄连水提物肠渗透液与大鼠肝微粒体进行体外温孵，考察木兰花碱的吸收、代谢特性，并采用高效液相色谱-线性离子阱/静电场轨道阱高分辨质谱法（HPLC-LTQ/Orbitrap MS）鉴定木兰花碱及黄连水提液肠渗透液中木兰花碱代谢产物，探讨木兰花碱在肠道和肝微粒体中的代谢规律，以及与黄连中共存成分可能存在的代谢性相互作用，为木兰花碱的新药开发和黄连临床合理应用提供参考。

1　材料

1.1　实验动物

无特定病原体（SPF）级 Sprague-Dawley（SD）大鼠 18 只，雄性，体质量（200±20）g，购于北京斯贝福生物技术有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK（京）2019-0010。本研究由北京中医药大学医学与实验动物伦理委员会批准，编号：BUCM-4-2021090305-3065。

1.2　试药

雄性 SD 大鼠肝微粒体 [汇智泰康生物技术（北京）有限公司，蛋白质量浓度为 20 mg·mL^{-1}]；黄连饮片（北京本草方源药业集团有限公司，批号：20191124，经北京中医药大学中药学院张贵君教授鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎，木兰花碱质量分数为 4.35 mg·g^{-1}）；对照品木兰花碱（批号：MUST-12022901，纯度>98%，成都曼斯特生物科技有限公司）；对照品荷叶碱（内标，批号：111566-200402，中国食品药品检定研究院，供含量测定用）；乙腈、甲醇（色谱纯，美国 Fisher 公司）；甲酸（色谱纯，美国 MREDA 公司）；水为超纯水；其他试剂均为分析纯。

1.3　仪器

TSQ Quantum 型液质联用仪 [配有大气压化学离子源（APCI）、电喷雾离子源（ESI）及 Xcalibur 数据系统]、LTQ-Orbitrap 型电喷雾液相质谱联用仪 [包括电喷雾离子源（ESI）、Xcalibur 数据处理系统] 均购于美国 Thermo Scientific 公司；VORTEX GENIVS 3 型漩涡混匀仪（德国 IKA 公司）；MTN-2800D 型氮气吹干仪（天津奥特赛恩斯仪器有限公司）。

2　方法

2.1　溶液的制备

2.1.1　Krebs-Ringer′s 肠营养液　分别称取 NaCl 7.80 g、KCl 0.35 g、$CaCl_2$ 0.37 g、NaH_2PO_4 0.32 g、$NaHCO_3$ 1.37 g、葡萄糖 1.40 g、$MgCl_2$ 0.02 g，加蒸馏水溶解并定容于 1000 mL，摇匀并调节 pH 至 7.4，即得。

2.1.2　0.15 mol·L^{-1} KCl 缓冲液　精密称取 KCl、Tris、乙二胺四乙酸（ETDA）、蔗糖适量，超纯水定容至体系含有 0.15 mol·L^{-1} KCl、10 mmol·L^{-1} Tris、1 mmol·L^{-1} ETDA、0.25 mmol·L^{-1} 蔗糖溶液，充分混匀后用 HCl 调节 pH 至 7.4，即得。

2.1.3　还原型辅酶Ⅱ（NADPH）启动系统　精密称取 $NADPNa_2$、6-磷酸葡萄糖二钠（G-6-P）、6-磷酸葡萄糖脱氢酶（G-6-PDH）、$MgCl_2$ 适量，超纯水定容至体系含有 1 mmol·L^{-1} $NADPNa_2$、20 mmol·L^{-1} G-6-P、2 U·L^{-1} G-6-PDH、20 mmol·L^{-1} $MgCl_2$，现用现配。

2.1.4　木兰花碱对照品储备液　精密称取木兰花碱对照品适量，加甲醇制成质量浓度为 3.244 mg·mL^{-1} 的木兰花碱对照品储备液，备用。

2.1.5　荷叶碱对照品溶液　精密称取内标荷叶碱对照品适量，加甲醇制成质量浓度为 0.434 mg·mL^{-1} 的荷叶碱内标对照品储备液，备用。

2.1.6　木兰花碱供试品溶液　取一定量的木兰花碱对照品储备液，加 Krebs-Ringer′s 肠营养液稀释成质量浓度为 20 μg·mL^{-1} 的木兰花碱供试品溶液。

2.1.7　黄连水提液　制备方法同文献[12]，临用前用 Krebs-Ringer′s 肠营养液稀释成木兰花碱质量浓度为 20 μg·mL^{-1} 的黄连水提液。

2.2　HPLC-LTQ/Orbitrap MS 测定条件

2.2.1　定量 HPLC-LTQ/Orbitrap MS 条件　色谱条件和质谱条件同文献[12]。

2.2.2　定性 HPLC-LTQ/Orbitrap MS 条件

2.2.2.1　色谱条件　Agilent TC-C_{18} 色谱柱（150 mm×4.6 mm，5 μm）；采用 C_{18} 保护柱（10 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈（A）-0.1% 甲酸（B），梯度洗脱（0~5.0 min，5%A；5.0~5.1 min，5%~15%A；5.1~10.0 min，15%A；10.0~20.0 min，15%~60%A；20.0~21.0 min，60%~80%A；21.0~25.0 min，80%A）；流速：1.0 mL·min^{-1}；柱温：30 ℃；进样体积：10 μL；分流比：4∶1。

2.2.2.2　质谱条件　LTQ-Orbitrap 型电喷雾液相质谱联用仪，ESI 电压：4000 V；毛细管电压：35 V；管透镜电压：110 V；毛细管温度：350 ℃；常压化学电离子源（APCI）雾化室温度：300 ℃；鞘气体积流量：30 L·min^{-1}；辅助气体积流量：10 L·min^{-1}；正离子采集模式；质量扫描范围 *m*/*z* 100~1000。

2.3　肠渗透液收集

取 SD 大鼠 18 只，随机分为 3 组，每组 6 只，分别为空白组、木兰花碱 20 μg·mL^{-1} 肠吸收组、黄连水提液（含木兰花碱 20 μg·mL^{-1}）肠吸收组[13]。

实验前，大鼠禁食 12 h，自由饮水。25% 乌拉坦腹腔注射麻醉，将麻醉大鼠固定于手术台板上，打开腹腔，取出十二指肠（距幽门 1 cm 处取 10 cm）、空肠（距幽门 15 cm 处取 10 cm）、回肠（盲肠上 20 cm 处取 10 cm）、结肠（从盲肠后端开始往下取 10 cm），用预温的 37 ℃ Krebs-Ringer′s 液灌流冲洗肠内容物。向各组肠囊中分别注入 Krebs-Ringer′s 液、木兰花碱及黄连供试品溶液各 1.0 mL，将肠囊放入已预温的 Krebs-Ringer′s 肠营养液 10 mL 中，持续通入 5% CO_2，保持 37 ℃恒温，温孵 120 min，等量吸取各肠段渗透液混合，作为各组肠渗透液。

2.4　肝微粒体代谢动力学实验

肝微粒体孵育体系包含终质量浓度为 1.0 mg·mL^{-1} 的大鼠肝微粒体、100 ng·mL^{-1} 的木兰花碱肠渗透液或黄连水提液肠渗透液（含 100 ng·mL^{-1} 木兰花碱）和 1 倍体积的 NADPH 启动系统（相当于终浓度为 1 mmol·L^{-1} $NADPNa_2$、20 mmol·L^{-1} G-6-P、2 U·L^{-1} G-6-PDH、20 mmol·L^{-1} $MgCl_2$）和 0.15 mol·L^{-1} KCl 缓冲液适量，总体积为 1.6 mL。其中有机溶剂的量不超过总体积的 1%。温孵系统在 37 ℃水浴预温孵 5 min，然后加入 NADPH 系统启动反应，37 ℃水浴振

荡温孵，分别在0、15、30、45、60、90、120 min时取样 200 μL，并立即加入 2 倍体积的冰乙腈（含 4. 66 ng·mL^{-1}荷叶碱）终止反应，涡旋混匀，15 000×g 离心 10 min，上清液氮气吹干，残渣用甲醇400 μL复溶，15 000×g 离心 15 min，取上清液 HPLC-LTQ/Orbitrap MS 分析木兰花碱含量，计算木兰花碱肝代谢动力学参数；温孵 90 min 的样品用于检测木兰花碱代谢产物。

上述温孵体系为 1. 6 mL，变化木兰花碱或黄连水提液肠渗透液（含相同质量浓度的木兰花碱）的质量浓度，使木兰花碱终质量浓度为10、20、40、80、160、320 ng·mL^{-1}，于 37 ℃水浴振荡孵育 30 min，其余操作同上，进行HPLC-MS分析，考察不同质量浓度木兰花碱肝代谢动力学特性。

2. 5　数据处理与分析

2. 5. 1　半衰期（$T_{1/2}$）、固有清除率（CL_{int}）及清除率（CL）计算　将木兰花碱的0时质量浓度作为100%，其他时间点的质量浓度与0时质量浓度相比得到木兰花碱的剩余百分比。各时间点的剩余百分比的自然对数与相应的温孵时间之间回归求得斜率（k），求得原药微粒体代谢的 $T_{1/2}$（min），应用 Well Stirred Model 对微粒体代谢的数据进行外推可得到木兰花碱在大鼠肝中的 CL_{int}（mL·min^{-1}·kg^{-1}）和肝 CL（mL·min^{-1}·kg^{-1}）。

2. 5. 2　最大代谢速率（V_{max}）和米氏常数（K_m）计算　计算木兰花碱的代谢速率 V（μmol·min^{-1}·g^{-1}），采用 Line Weaver-Burk 双倒数作图法，以代谢速率的倒数（1/V）对木兰花碱质量浓度的倒数（1/[S]）作图，计算得 K_m 和 V_{max}。其中截距的倒数即 V_{max}，斜率与 V_{max} 的乘积即为 K_m，得出木兰花碱的体外代谢动力学参数。

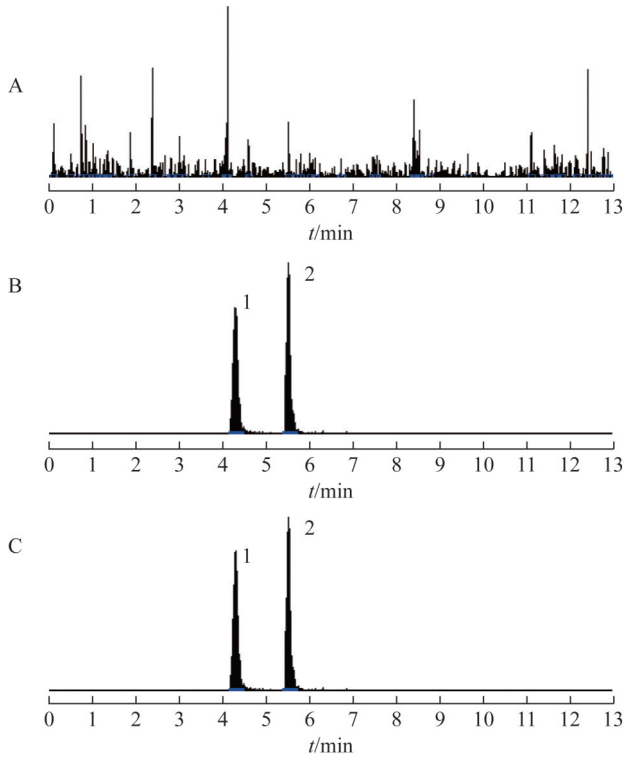
2. 5. 3　统计分析　代谢动力学参数采用（$\bar{x} \pm s$）表示。采用 SPSS Statistic 19. 0 对数据进行统计分析，计算木兰花碱的肝代谢动力学参数。肝代谢动力学参数的对比分析采用 t 检验。

3　结果

3. 1　代谢动力学结果

3. 1. 1　HPLC-LTQ/Orbitrap MS 测定方法学考察

3. 1. 1. 1　专属性　分别制备大鼠空白肝微粒体温孵液、空白肝微粒体温孵液+木兰花碱肠渗透液（51 ng·mL^{-1}）及内标（荷叶碱，4. 66 ng·mL^{-1}）、60 min 木兰花碱肠渗透液的肝微粒体温孵液，按照 **2. 4** 项下方法处理后进行 HPLC-LTQ/Orbitrap MS 分析。结果表明，在木兰花碱和内标的出峰位置肝微粒体中的内源性成分无干扰，见图1。



注：A. 大鼠空白肝微粒体温孵液；B. 空白肝微粒体微温孵液+木兰花碱肠渗透液；C. 60 min 木兰花碱肠渗透液的肝微粒体微温孵液；1. 木兰花碱；2. 荷叶碱。

图1　大鼠肝微粒体温孵液中各样品选择反应监测（SRM）色谱图

3. 1. 1. 2　标准曲线及定量下限　精密吸取木兰花碱储备液适量，置于灭活的大鼠肝微粒体温孵体系中，使体系中木兰花碱的终质量浓度依次为 5. 1、10. 2、20. 4、51. 0、102. 0、204. 0、510. 0 ng·mL^{-1}，取上述溶液 200 μL 与 2 倍体积的冰乙腈（含 4. 66 ng·mL^{-1}荷叶碱）混合，其余按 **2. 4** 项下方法处理，HPLC-LTQ/Orbitrap MS 测定。以木兰花碱质量浓度为横坐标（X），木兰花碱与内标的峰面积比值为纵坐标（Y），用加权最小二乘法进行回归运算，求得标准回归方程 Y= 0. 021 1X - 0. 013 1（r=0. 998 4）。木兰花碱质量浓度为 5. 1~510. 0 ng·mL^{-1}时线性关系良好。按信噪比（S/N）=10 计算，定量下限为 5. 1 ng·mL^{-1}。

3. 1. 1. 3　准确度和精密度　取木兰花碱低、中、高

3 个质量浓度（10. 2、51. 0、204. 0 ng·mL^{-1}）的肝微粒体溶液，按 **2. 4** 项下方法操作，同一天内对各质量浓度进行 6 样本测定，连续测定 3 d，并与标准曲线同时进行，由当日的标准曲线计算各样品质量浓度。分别计算准确度和精密度，结果 RSD 分别为 4. 32%、3. 51%，符合方法学测定要求。

3. 1. 1. 4　提取回收率和基质效应　配制低、中、高 3 个质量浓度的木兰花碱肝微粒体对照品溶液，每个质量浓度 6 份，按 **2. 4** 项下方法处理后检测，记录木兰花碱和内标的峰面积（样品 A）。另取离心管 5 支，预处理后的空白肝微粒体溶液中添加已知质量浓度的木兰花碱和内标对照品溶液，记录不同质量浓度木兰花碱和内标的峰面积（样品 B）。用流动相配制低、中、高 3 个质量浓度不含基质的纯样品溶液，测定响应值（样品 C）。提取回收率的计算值为样品 A 与样品 C 的色谱峰面积比；基质效应的计算值为样品 B 与样品 C 的色谱峰面积比。同时考察内标在 4. 66 ng·mL^{-1}时的基质效应和提取回收率。结果 RSD 分别为 3. 73%、3. 94%，符合测定要求。

3. 1. 1. 5　稳定性　制备木兰花碱质量浓度为 10. 2、51. 0、204. 0 ng·mL^{-1}的含药肝微粒体，每个质量浓度 5 份，置于 - 20 ℃冰箱中冷冻，然后室温下解冻，重复冻融 3 次，最后一次室温解冻后，按 **2. 4** 项下方法处理后测定，计算冻融稳定性；制备木兰花碱质量浓度为 10. 2、51. 0、204. 0 ng·mL^{-1}的含药肝微粒体，每个质量浓度 5 份，按 **2. 4** 项下方法处理后，在室温（20 ℃）条件下放置 8 h 后进样，测定木兰花碱质量浓度，计算室温放置稳定性。结果 RSD 分别为 3. 25%、3. 77%，符合测定要求。

3. 1. 2　木兰花碱代谢动力学实验结果

3. 1. 2. 1　$T_{1/2}$、CL_{int}及 CL　黄连水提液中木兰花碱在各个时间点的剩余率均高于木兰花碱单体，表明黄连水提液中木兰花碱在大鼠肝微粒体中代谢速率较慢（表 1）。取表 1 中 60 min 对应的曲线直线段数据求斜率（k），求得 $T_{1/2}$、CL_{int}和 CL，结果见表 2。

3. 1. 2. 2　V_{max}和 K_m　不同质量浓度的木兰花碱及黄连水提液肠渗透液进行大鼠肝微粒体温孵，计算得木兰花碱的 V，结果见表 3。两组中随着木兰花碱质量浓度增大，代谢速率均增大，且木兰花碱单体组代谢速率高于黄连水提液组。采用 Line Weaver-Burk 双倒数作图法，计算得 K_m和 V_{max}，结果见图 2、表 2。

3. 1. 2. 3　动力学结果比较分析　肝微粒体代谢稳定性的评价标准如下：$T_{1/2}$<30 min，表明受试化合物代谢不稳定；$T_{1/2}$为 30~90 min，表明受试化合物代谢稳定性为中等；$T_{1/2}$>90 min，表明受试化合物代谢稳定性良好[14]。由此可见，木兰花碱及黄连水提液肠渗透液中木兰花碱在大鼠肝微粒体中均具有中等稳定性。K_m值代表底物与酶的亲和性，K_m值越大，表明亲和性越小，表明黄连水提液肠渗透液中木兰花碱对大鼠肝微粒体的亲和性大于木兰花碱肠渗透液。

由表 2 可知，两组中木兰花碱体外大鼠肝微粒体代谢动力学差异具有统计学意义（P<0. 05）。$T_{1/2}$、CL_{int}、CL 和 V_{max}结果表明，黄连水提液肠渗透液较木兰花碱肠渗透液中木兰花碱在大鼠肝微粒体中代谢和消除速率慢，$T_{1/2}$长，从两组中木兰花碱在大鼠肝微粒体中的代谢动力学参数变化可知，黄连中其他成分可增强木兰花碱与大鼠肝微粒体的亲和性，降低木兰花碱在大鼠肝微粒体中的代谢和消除速率。

3. 2　代谢产物分析

药物在生物体内发生代谢转化反应时其基本骨架结构及亚结构不会发生变化，这是因为药物分子主要进行官能团反应或者是与内源性极性分子发生结合反应等，因此代谢产物具有原药的质谱特征裂解碎片及中性丢失。在正离子检测模式下，将给药

表 1　肝微粒体温孵体系中木兰花碱剩余率（$\bar{x}\pm s$, n=3）

%

组别	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min	90 min	120 min
木兰花碱组	100.00±4.73	80.91±3.55	56.09±1.32	46.07±2.90	32.84±1.68	26.06±1.60	19.76±1.49
黄连水提液组	100.00±6.33	86.22±1.67	71.07±3.01	52.45±2.64	39.45±1.87	30.18±2.11	24.45±2.18

表 2　木兰花碱在大鼠肝微粒体中的代谢动力学参数（$\bar{x}\pm s$, n=3）

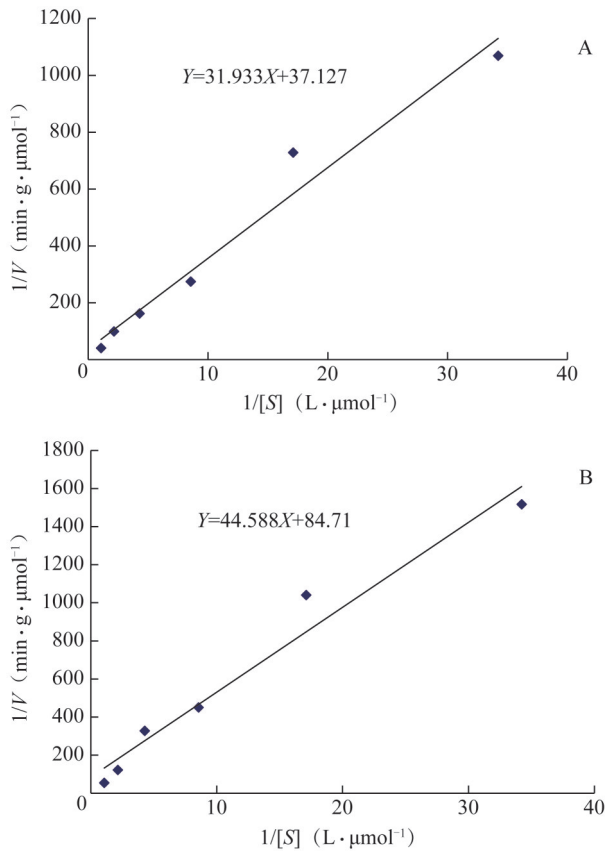
组别	$T_{1/2}$/min	CL_{int}/mL·min^{-1}·kg^{-1}	CL/mL·min^{-1}·kg^{-1}	K_m/μmol·L^{-1}	V_{max}/μmol·L^{-1}·min^{-1}
木兰花碱组	37.35±2.98	23.29±2.97	11.10±1.40	0.85±0.12	0.03±0.02
黄连水提液组	44.22±5.10**	19.69±5.10**	10.09±2.61**	0.53±0.16*	0.01±0.02*

注：与木兰花碱肠渗透液组比较，$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01。

表 3　大鼠肝微粒体中不同质量浓度木兰花碱代谢速率

（$\bar{x}\pm s$, n=3, $\times10^{-3}$）

组别	$[S]$/μmol·L^{-1}	V/μmol·min^{-1}·g^{-1}
木兰花碱组	29.2	0.9±0.14
	58.5	1.4±0.25
	116.9	3.6±0.67
	233.8	6.2±1.13
	467.6	10.1±1.88
	935.2	24.4±3.56
黄连水提液组	29.2	0.7±0.13
	58.5	1.0±0.19
	116.9	2.2±0.41
	233.8	3.1±0.63
	467.6	8.2±1.32
	935.2	18.5±2.17

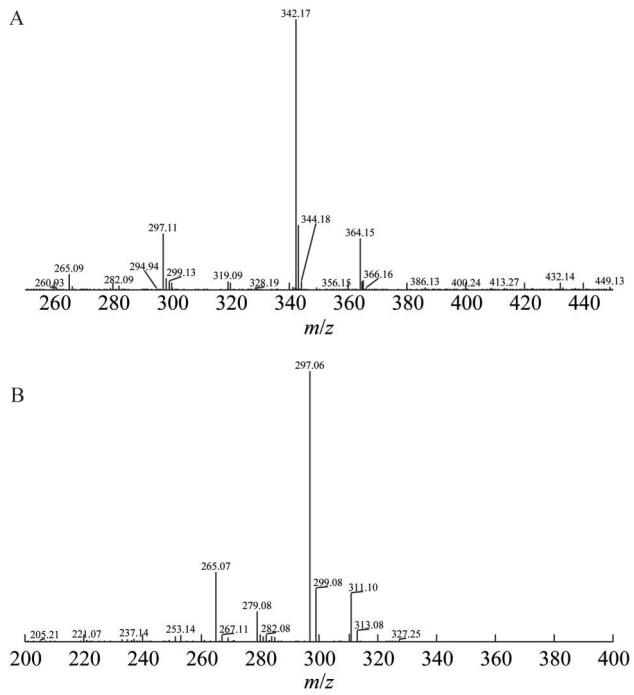


注：A. 木兰花碱；B. 黄连水提液。

图 2　木兰花碱质量浓度与代谢速率的双倒数曲线（n=3）

后样品与空白样品的一级全扫描质谱进行对比分析，寻找原药可能的Ⅰ、Ⅱ相代谢产物，分析这些代谢产物分子离子的多级质谱，进一步结合药物在生物体内的一般代谢规律，以推测各代谢产物结构。

木兰花碱及黄连水提液肠渗透液的肝微粒体温孵液经 HPLC-LTQ/Orbitrap MS 检测，木兰花碱的分子离子峰 m/z 342.17 为基峰，二级碎片为 m/z 311.10 $[M-MeO]^+$，297.06 $[M-C_2H_7N]^+$，282.08 $[M-C_2H_7N-Me]^+$，265.07 $[M-C_2H_7N-MeOH]^+$，237.14 $[M-C_2H_7N-MeOH-CO]^+$（图 3）。一级全扫描质谱中木兰花碱的 t_R 为 10.33 min，其提取离子流图见图 4。



注：A. MS^1；B. MS^2。

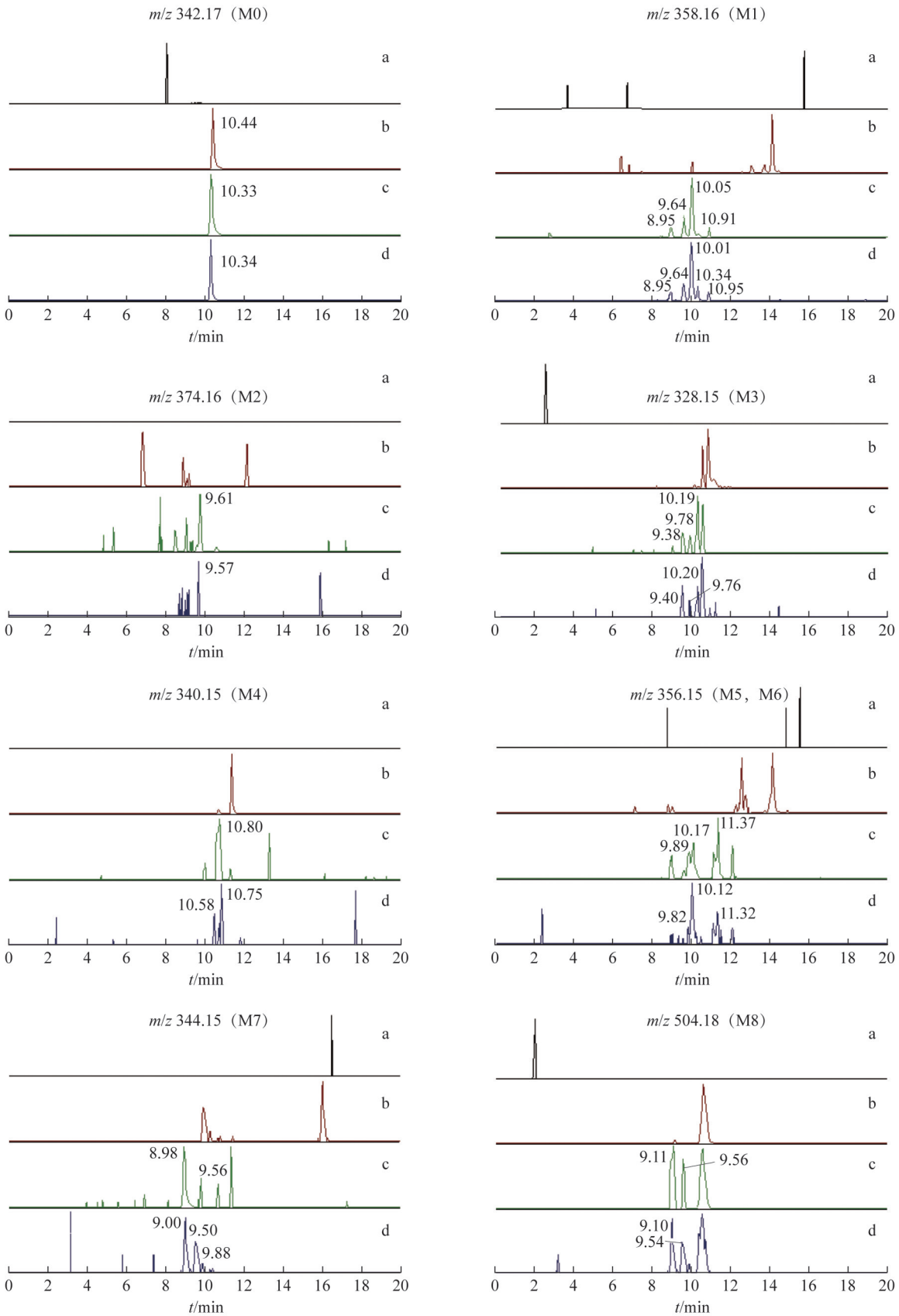
图 3　木兰花碱的 MS^1 及 MS^2 碎片离子质谱图

包括位置异构体在内，木兰花碱经肠渗透后在大鼠肝微粒体温孵体系中共检测到原型及 5 个代谢产物（M1~M3、M5、M6），而黄连水提液经肠渗透后在大鼠肝微粒体温孵体系中共检测到原型及 8 个代谢产物（M1~M8），见图 4、表 4。木兰花碱肠-肝体外的代谢途径见图 5。

M1（m/z 358.16）和 M2（m/z 374.16）同其相应的二级碎片离子比木兰花碱（m/z 342.17）分别多 16、32。M1 主要碎片分子为 m/z 340.11，327.13，313.10，298.23，M2 主要碎片分子为 m/z 358.16，342.16，329.11，297.08。因此，代谢产物 M1 和 M2 分别为木兰花碱一羟基化和二羟基化的产物。

M3（m/z 328.15）比木兰花碱（M0）少 14，M3 主要碎片离子为 m/z 297.06，283.05，265.07，251.07，由此可推测 M3 为木兰花碱一脱甲基产物。

M4（m/z 340.15）比木兰花碱（M0）少 2，M4 主要碎片离子为 m/z 309.07，295.11，280.17，263.03，



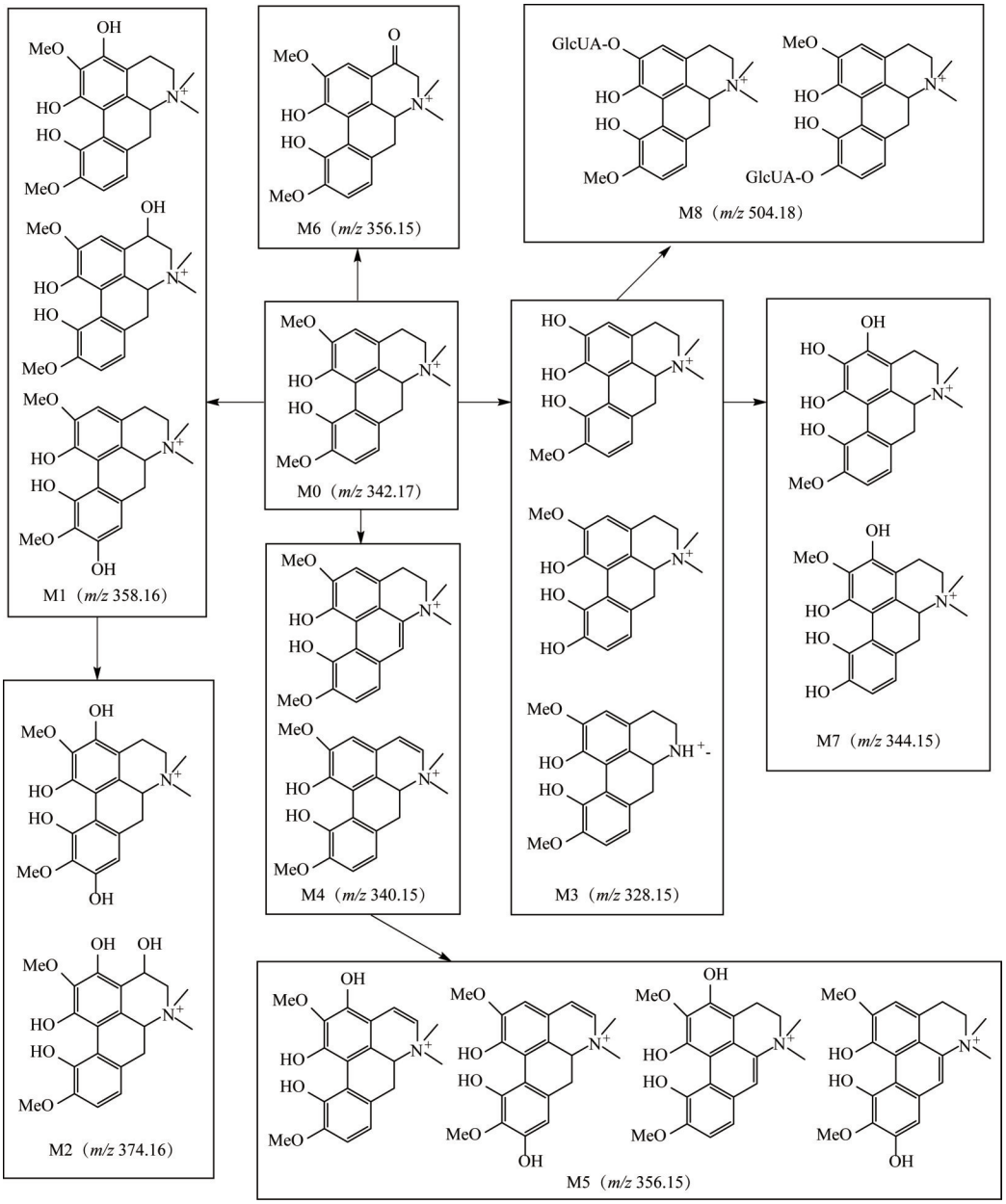
注：a. 空白肝微粒体；b. 黄连水提液；c. 黄连水提液肠渗透液；d. 黄连肠渗透液的肝微温孵液；M0. 木兰花碱。

图 4　大鼠肝微粒体中木兰花碱及其代谢产物的提取离子色谱图

表 4　大鼠肠-肝体外温孵体系中的木兰花碱及其代谢产物

代谢产物	$[M]^+$（*m/z*）	代谢途径	木兰花碱组	黄连水提液组	t_R/min	碎片离子（*m/z*）
M0	342.17	原型	+	+	10.34	311.10，297.06，282.08，265.07，237.14
M1	358.16	一羟基化	+	+	8.96，9.64，10.01	340.11，327.13，313.10，298.23
M2	374.16	二羟基化	+	+	9.57	358.16，342.16，329.11，297.08
M3	328.15	一去甲基化	+	+	9.40，976，10.20	297.06，283.05，265.07，251.07
M4	340.15	脱氢	+	+	10.58，10.75	309.07，295.11，280.17，263.03
M5	356.15	M4一羟基化	+	+	9.82，10.12	325.10，311.08，296.11，279.04
M6	356.15	酮基化	–	+	11.32	325.10，311.08，296.11，279.04
M7	344.15	M3一羟基化	–	+	9.00，9.50，9.88	313.09，299.07，284.07，267.04
M8	504.18	M3葡萄糖醛酸化	–	+	9.10，9.54	328.14，297.09，283.04，265.04

注：+表示检测到；– 表示未检测到；M0. 木兰花碱。



注：GlcUA. 葡萄糖醛酸。

图 5　黄连水提液肠渗透液中木兰花碱在大鼠肝微粒体中的代谢途径

因此推测M4是木兰花碱一脱氢代谢产物。

M5（*m/z* 356. 15）和M6（*m/z* 356. 15）为同分异构体，两者主要碎片离子均为*m/z* 325. 10，311. 08，296. 11，279. 04。M6位置异构体的t_R分别为9. 82、10. 12 min，其极性大于M0；M6的t_R为11. 32 min，其极性小于M0，因此推测M5为M4的一羟基化代谢产物，M6为M0酮基化代谢产物。

M7的分子离子峰为*m/z* 344. 15，比M3的分子离子峰*m/z* 328. 15多16。M7的碎片离子为*m/z* 313. 09，299. 07，284. 07，267. 04，因此M7为M3一羟基化代谢产物。

M8（*m/z* 504. 18）比M3分子离子峰*m/z* 328. 15多176，且M8的主要碎片离子为*m/z* 328. 14，297. 09，283. 04，265. 04，同M3的二级碎片离子相同，因此推测M8为代谢产物M3加1分子葡萄糖醛酸的代谢产物。

4　讨论

在所有参与药物生物转化的器官中，肝脏是最主要的场所，药物在肝脏中的代谢直接与其药理活性和毒性特征相关，影响药物在临床上的安全性和有效性。与体内代谢研究相比，体外代谢研究可排除内源性物质的干扰，具有简单快速、结果重现性好等优点，有助于直接观察药物的代谢特征，适用于体内代谢转化率低的成分及候选化合物的早期代谢研究及筛选[15-16]。肝微粒体温孵法是研究药物体外肝代谢的常用方法，该法代谢时间短、重复性好，方便大量代谢样品操作。

通常采用的将药物与肝微粒体一同温孵的体外肝代谢研究方法不能客观地反映成分复杂的中药提取物口服后在体内肝代谢的情况，需要综合体内实验才能最终确证[17]。因此本研究对体外肝代谢动力学实验方法进行了新的尝试，首次采用肠渗透液-肝微粒体温孵联动模型探讨黄连提取物中木兰花碱体外肝代谢动力学，更接近于体内研究过程，数据更科学可靠。

黄连水提液中木兰花碱的K_m值低于木兰花碱单体（P<0. 05），表明黄连水提液中木兰花碱对大鼠肝微粒体的亲和性大于木兰花碱单体；黄连水提液组V_{max}、CL_{int}及CL均低于木兰花碱单体组（P<0. 05），黄连水提液组$T_{1/2}$大于木兰花碱组（P<0. 01），表明黄连水提液中木兰花碱在大鼠肝微粒中代谢和消除速率变慢，$T_{1/2}$更长，表明黄连中其他成分可降低木兰花碱在大鼠肝微粒体中的代谢和消除速率。

木兰花碱单体与黄连水提液中木兰花碱的代谢产物存在差别。在大鼠肠-肝温孵体系中，木兰花碱单体代谢后检测到原型成分及5个代谢产物，比单独的肠渗透液多1个二羟基化代谢物。黄连水提液中检测到木兰花碱原型及8个代谢产物，比单独的肠渗透液多检测出1个二羟基化代谢物及一脱甲基后羟基化次生代谢产物，但没有检测到木兰花碱去二甲基代谢物及一羟基化后葡萄糖化次生代谢产物[18]。木兰花碱代谢途径主要为羟基化、去甲基化、脱氢、酮基化及Ⅰ相代谢产物进一步*O*-葡萄糖化和*O*-葡萄糖醛酸化。木兰花碱在肠道和肝微粒体中均可产生代谢，肠渗透液中一羟基化代谢产物及一脱甲基代谢产物在肝微粒体中进一步进行羟基化代谢。黄连中其他成分可降低木兰花碱在大鼠肝微粒体中的代谢速率、增加其代谢产物的数目，提示这可能对降低黄连中木兰花碱吸收和消除的速率有一定影响作用。

参考文献

[1] 盖晓红，刘素香，任涛，等. 黄连的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药，2018，49(20)：4919-4927.

[2] 付琳，付强，李冀，等. 黄连化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药学报，2021，49(2)：87-92.

[3] 陈瑞，吴云，田维毅. 黄连化学成分及其影响相关代谢途径的研究进展[J]. 湖南中医杂志，2016，32(4)：190-192.

[4] 成焕波，胡辉，孙代华，等. 黄连标准汤剂HPLC特征图谱的量质传递研究[J]. 华西药学杂志，2020，35(5)：509-512.

[5] OKON E，KUKULA-KOCH W，HALASA M，et al. Magnoflorine-isolation and the anticancer potential against NCI-H1299 lung，MDA-MB-468 breast，T98G glioma，and TE671 rhabdomyosarcoma cancer cells[J]. Biomolecules，2020，10(11)：1532.

[6] LUO N X，JIN L，YANG C Q，et al. Antifungal activity and potential mechanism of magnoflorine against *Trichophyton rubrum*[J]. J Antibiot（Tokyo），2021，74(3)：206-214.

[7] CHERKU P D. Inhibitory activity of leaf extract of *Tinospora cordifolia* and magnoflorine on aldose reductase for control of diabetes[J]. Int J Clin Pharm-Net，2019，13：186-192.

[8] TIAN W，XIE X J，CAO P L. Magnoflorine improves

sensitivity to doxorubicin（DOX）of breast cancer cells via inducing apoptosis and autophagy through Akt/mTOR and p38 signaling pathways[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121: 109139.

[9] XUE B J, ZHAO Y Y, MIAO Q, et al. *In vitro* and *in vivo* identification of metabolites of magnoflorine by LC LTQ-Orbitrap MS and its potential pharmacokinetic interaction in Coptidis Rhizoma decoction in rat [J]. Biomed Chromatogr, 2015, 29(8): 1235-1248.

[10] 杜瑶, 陈瑞, 朱高峰, 等. 新型降糖化合物 LSM-13 在大鼠肝微粒体中的稳定性研究及代谢产物分析[J]. 中国药房, 2021, 32(17): 2059-2065.

[11] 张丽, 蔡进, 班玉娟, 等. 采用 UPLC-MS/MS 法研究树豆酮酸 A 在不同种属肝微粒体中的代谢差异[J]. 中国药房, 2019, 30(18): 2497-2502.

[12] 薛宝娟, 赵雯雯, 孙秀蕊, 等. 黄连共存成分对木兰花碱在大鼠胆汁、尿、粪中排泄的影响[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(14): 3908-3914.

[13] SHI S, KAMALPREET, MANJUL M. Development and evaluation of novel microemulsion based oral formulations of 5-fluorouracil using non-everted rat intestine sac model[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2012, 38(3): 294-300.

[14] 陈瑞, 张丽, 蔡进, 等. 新型胰岛素增敏剂 ZG02 在大鼠肝微粒体中的代谢稳定性研究[J]. 中国药房, 2018, 29(24): 3359-3364.

[15] 夏媛媛, 杨沮勤, 朱伊婷, 等. UPLC-MS/MS 研究抗肿瘤化合物 HK-7 在不同种属肝微粒体中的代谢稳定性和代谢酶表型[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(2): 178-183.

[16] 杨增艳, 张颖, 李嘉, 等. 东莨菪内酯在大鼠肝微粒体孵育体系中的代谢产物分析及其含药血清对大鼠肝星状细胞的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(2): 9-14.

[17] 陈鹏, 汪静, 张红盼, 等. 药物体外肝代谢的研究方法[J]. 中国药房, 2017, 28(19): 2703-2707.

[18] XUE B J, ZHAO Y Y, SU J, et al. *In vitro* intestinal absorption and metabolism of magnoflorine and its potential interaction in coptidis rhizoma decoction in rat [J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2017, 42(2): 281-293.

（收稿日期：2022-08-03　编辑：田苗）