

葛根芩连配方颗粒在大肠湿热证模型大鼠尿液中代谢产物研究

陈丽红¹, 范慧佳², 唐于平³, 卞勇¹, 杨念云¹, 井山林¹, 王强⁴

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046

2. 合肥医工医药有限公司, 安徽 合肥 230088

3. 南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室, 江苏 南京 210046

4. 中国药科大学 中药分析教研室, 江苏 南京 210009

摘要: **目的** 研究葛根芩连配方颗粒(简称葛根芩连颗粒)在大肠湿热证模型大鼠尿液中的代谢产物。**方法** 采用综合因素(高糖和高脂饮食+高温和高湿环境+肠产毒性大肠杆菌致病因子)制备大肠湿热证大鼠模型;利用 HPLC-DAD-MS 技术对大鼠 ig 葛根芩连颗粒后尿液中代谢产物进行分析,检测波长 272 nm;流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液,流动相 B 为乙腈-甲醇(6:4),梯度洗脱。**结果** 从给予葛根芩连颗粒的大鼠尿液中发现并鉴定了 5 种主要代谢产物,分别为葛根素、异甘草素、甘草素、汉黄芩素、千层纸素 A,其中葛根素来自葛根,汉黄芩素与千层纸素 A 来自黄芩,异甘草素与甘草素来自甘草。**结论** 在大肠湿热证模型大鼠尿液中,葛根芩连颗粒中黄芩与甘草的代谢产物主要以苷元为主,葛根中的葛根素主要以原形排出。

关键词: 葛根芩连配方颗粒;大肠湿热证;代谢产物;葛根素;汉黄芩素

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)08-1570-04

Metabolites of Gegen Qinlian Dispensing Granule in urine of rats with large intestinal damp-heat syndrome

CHEN Li-hong¹, FAN Hui-jia², TANG Yu-ping³, BIAN Yong¹, YANG Nian-yun¹, JING Shan-lin¹, WANG Qiang⁴

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. Hefei Yigong Medicine Co., Ltd., Hefei 230088, China

3. Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

4. Department of Chinese Materia Medica Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: **Objective** To study the metabolites of Gegen Qinlian Dispensing Granule (GQDG) in urine of rats model with large intestinal damp-heat syndrome. **Methods** The animal model with large intestine damp-heat syndrome was developed by multiple factors (high glucose and high fat diet, environment under high humidity and high temperature, and pathogenic biological factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*). The metabolites in urine of rats after ig administration of GQDG were analyzed by HPLC-DAD-MS. The detection wavelength was 272 nm; Mobile phase was 0.1% formic acid-water and acetonitrile-methanol (6:4). **Results** Five components were identified as puerarin (from *Puerariae Radix*), isoliquiritigenin, liquiritigenin (from *Glycyrrhizae Preparata Radix*), wogonin, and oroxylin A (from *Scutellariae Radix*). **Conclusion** Metabolites of *Scutellariae Radix* and *Glycyrrhizae Preparata Radix* in GQDG in urine of model rats with large intestinal damp-heat syndrome are mainly aglycone, and the metabolites of puerarin in *Puerariae Radix* are unchanged and mainly excreted by prototype via urine.

Key words: Gegen Qinlian Dispensing Granule (GQDG); large intestinal damp-heat syndrome; metabolites; puerarin; wogonin

大肠湿热证是临床常见病、多发病,主要以大便次数增多和性状异常为主要症状。随着生活水平的不断提高、生活节奏的加快及饮食结构的改变,与大肠湿热证相关的疾病呈明显上升趋势。葛根芩

收稿日期: 2011-10-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30901995)

作者简介 陈丽红(1975—),女,浙江台州人,博士,主要研究方向为中药及复方效应物质基础及质量评价。

Tel: (025)85811074 E-mail: clh_helen@163.com

连汤是记载于《伤寒论》的经典方,主要由葛根、甘草(炙)、黄芩、黄连组成^[1-2],在临床上治疗大肠湿热证有很好的疗效。近几年,对葛根芩连汤的成分、药效、入血成分以及治疗大肠湿热证的作用机制研究均有相关报道^[1-3]。但对葛根芩连汤治疗大肠湿热证时其在尿液中的代谢产物的研究鲜见报道。葛根芩连汤中4味药材合煎会降低黄连指标性成分盐酸小檗碱的量,其主要原因是盐酸小檗碱能与黄芩苷等成分形成沉淀。因此笔者采用葛根、黄芩和甘草三药合煎,黄连单煎的工艺制备葛根芩连配方颗粒(简称葛根芩连颗粒),并采用 HPLC-DAD-MS 技术对葛根芩连制剂进行分析;结果表明汤剂中无法检测到黄芩素成分,其余成分的量与配方颗粒中的相似^[4]。前期研究将葛根芩连颗粒与汤剂进行抗腹泻、抑菌药效学比较,发现葛根芩连颗粒剂的疗效均优于汤剂(数据待发表)。

本实验检测大肠湿热模型大鼠给予葛根芩连颗粒后大鼠尿液中的代谢产物,为进一步筛选葛根芩连颗粒治疗大肠湿热证的药效物质和探索其作用机制提供参考。

1 材料

1.1 药品与试剂

葛根、黄芩、黄连、炙甘草,均购于安徽丰原铜陵中药饮片有限公司,经南京中医药大学药学院陈丽红博士鉴定,中国药科大学中药分析教研室王强教授核实分别为野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根、黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根、黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎、甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的炮制加工品。

葛根芩连颗粒自制。葛根素对照品,购于中国药品生物制品检定所,批号 110752-200912,质量分数>98%。甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯。

1.2 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱系统(自动进样器、四元泵、柱温箱、DAD 检测器),美国 Agilent Technologies 公司;MS 用 Agilent 1100 Series LC/MSD SL 型离子阱质谱仪,德国 Agilent Technologies 公司,ESI 离子源;KH-3200E 型超声波清洗器,昆山市禾创超声仪器有限公司;BP211D 型电子天平,德国 Satorius 公司。

1.3 动物与菌种

SD 大鼠,清洁级,体质量(220±20)g,浙江省实验动物中心提供,合格证号为 SCXK(浙)

2008-0033。

肠产毒性大肠杆菌菌种,从江苏省中医院临床分离样品中提取,浓度为 1.0×10^9 /mL,采用肉汤液体培养基培养12h,至吸光度(A)值为0.6~0.8。

2 方法

2.1 葛根芩连颗粒的制备

取葛根2.4kg、黄芩0.9kg、炙甘草0.6kg合煎,第一煎加水量为10倍,第二煎为8倍,每次提取1.5h,共提取2次,2次提取液浓缩、干燥得到浸膏粉。黄连0.9kg单煎,第一煎加水量为12倍,第二煎为10倍,每次提取1.5h,共提取2次,提取液经浓缩、干燥得浸膏粉。将黄连浸膏粉与葛根、黄芩及炙甘草三药合煎的浸膏粉混合均匀,制粒,灌装得成品。复方颗粒中含葛根素4.17%、黄芩苷3.90%、小檗碱3.60%。

2.2 色谱条件

Lichrospher C₁₈ 柱(150mm×4.6mm, 5μm),预柱为 Zorbax ODS C₁₈ 柱(12.5mm×4.6mm, 5μm),检测波长272nm,柱温30℃,体积流量1.0mL/min,进样量20μL,流动相A为0.1%甲酸水溶液,流动相B为乙腈-甲醇(6:4),梯度洗脱:0~10min,10%~13%B;10~37min,13%~24%B;37~47min,24%~36%B,47~75min,36%~70%B,线性递增。

2.3 质谱条件

使用 Agilent 1100 Series LC/MSD SL 型离子阱质谱仪,ESI 离子源,正负离子模式。

2.4 模型制备、分组与给药

参照杨运高等^[5]的方法,将SD大鼠15只(雌雄兼用)随机分为对照组、模型组、葛根芩连颗粒组。模型组大鼠先以高糖、高脂饲料饲养10d,再置于高温仓(自制,温度35℃、相对湿度95%)中,每天连续放置8h,连续3d后ig给予肠产毒性大肠杆菌2mL/只(1×10^9 /mL),24h后再ig大肠杆菌1次,24h后ig等体积的蒸馏水;对照组大鼠喂饲普通饲料并ig等体积蒸馏水;葛根芩连颗粒组大鼠按上述方法造模后24h给药组ig给予葛根芩连颗粒4.47g/kg(以0.5%羧甲基纤维素钠为溶剂);每天给药1次,连续给药3d。

2.5 观察与指标检测

观察大鼠体温、毛发、精神状态、活动能力、进食量、粪便、舌苔等情况。

收集各组大鼠造模前0~24h尿液及给药后

0~24 h 尿液各 1 次, 置-80 °C 冰箱保存。取尿样 0.5 mL, 加入 0.5 mL 甲醇, 涡旋 3 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液供 HPLC-DAD-MS 分析。

2.6 数据处理

数据采用 SPSS 16.0 进行统计学处理, 均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 全部数据经方差齐性分析后, 组间显著性差异检验采用单因素方差分析, 其中各组用药前后显著性检验采用配对 *t* 检验。

3 结果

3.1 对大鼠一般状态的影响

实验前所有大鼠状态良好, 活动灵活, 皮毛洁白有光泽, 活动、摄食饮水正常, 大便成形, 体温正常。造模后, 随着造模时间的延长, 模型组大部分大鼠倦怠、嗜卧懒动、反应迟钝、毛发蓬松、颜色枯槁、饮食减少、排便次数增多、大便黏腻, *ig* 侵袭性大肠杆菌后大鼠体温明显升高。给药组大鼠 *ig* 葛根芩连汤后, 活动逐渐增加, 饮食量增加, 大便成型, 体温恢复到正常水平。各组大鼠体温变化见表 1。

3.2 葛根素的裂解规律

葛根素因为碳苷键相对稳定, 其准分子离子峰

表 1 葛根芩连颗粒对大肠湿热证大鼠体温的影响

($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of GQDG on body temperature of rats with large intestinal damp-heat syndrome ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	体温 / °C	
		给药前	给药后
对照		37.80±0.20	38.00±0.35
模型		40.54±1.04**	39.98±0.76**
葛根芩连颗粒	4.47	39.84±0.80**	38.28±0.72▲▲

与对照组比较: ***P*<0.01; 与模型组比较: ▲▲*P*<0.01

***P*<0.01 vs control group; ▲▲*P*<0.01 vs model group

m/z 415 [M-H]⁻ 相对较强, 葛根素还有 2 个主要碎片离子峰 *m/z* 294.9 [M-H-120]⁻、266.9 [M-H-120-28]⁻, 遵循 [M-H-120]⁻、[M-H-120-28]⁻ 裂解方式^[6]。

3.3 代谢产物的结构解析

结合葛根芩连颗粒代谢产物的正、负离子模式下所形成的分子离子峰及各碎片离子, 在其尿液样品中鉴定了 5 种代谢产物, 分别为葛根素、异甘草素、甘草素、汉黄芩素与千层纸素 A。结果见表 2。

表 2 葛根芩连颗粒在大肠湿热证模型大鼠尿液中代谢产物的 HPLC-DAD-MS 分析结果

Table 2 HPLC-DAD-MS analysis on metabolites of GQDG in rats with large intestinal damp-heat syndrome

编号	<i>t</i> / min	正离子		负离子		特征基团	λ_{\max} / nm	结构推测
		[M+H] ⁺	碎片离子	[M-H] ⁻	碎片离子			
1	2.0		未检测到	222.8	178.8		205, 257	未知
2	9.1		未检测到	204.9	115.0		276	未知
3	18.9		未检测到	433.0	204.9, 115.0		219, 249, 290	未知
4	21.9		未检测到	415.1	294.9, 266.9	M-H-C ₄ H ₈ O ₄ -CO	249, 305	葛根素
5	49.8		未检测到	254.9	148.9		240, 290, 370	异甘草素
6	50.4	257.1	未检测到	254.9	134.9	M-H-C ₈ H ₈ O	236, 272, 365	甘草素
7	52.1		未检测到	282.9	267.9	M-H-CH ₃	276, 316	汉黄芩素
8	55.9	391.0	149.0	未检测到	未检测到		240, 321	未知
9	58.2	390.7	149.1	未检测到	未检测到		242, 320	未知
10	61.7	未检测到	未检测到	257.0	109.1		238	未知
11	67.3	未检测到	未检测到	282.9	267.8	M-H-CH ₃	272, 320	千层纸素 A

4 讨论

4.1 流动相的选择与优化

由于复方样品中含有较多的成分, 为了得到较好的色谱行为, 本研究考察了不同配比甲酸水和不同有机相的色谱效果。甲酸水比例有 0.08%、0.1% 及 0.2%, 有机相有甲醇、乙腈、甲醇-乙腈 (5:1) 及乙腈-甲醇 (6:4)。经过研究最后采用了乙腈-甲

醇 (6:4)-0.1% 甲酸水为色谱流动相进行梯度洗脱。

4.2 代谢物分析

本研究给大肠湿热证大鼠 *ig* 葛根芩连颗粒后, 在其尿液样品中鉴定了 5 种代谢产物, 分别为葛根素、异甘草素、甘草素、汉黄芩素与千层纸素 A; 其中葛根素来自葛根药材, 汉黄芩素与千层纸素 A 来自黄芩药材, 异甘草素与甘草素来自甘草药材。

因黄连生物碱类成分在体内生物利用率较低, 配伍黄芩后其生物碱类成分的体内生物利用率更低。因此本实验未检测到相关生物碱成分及其代谢产物。据文献报道, 在大鼠尿液中黄芩苷除原型外, 其代谢产物主要是汉黄芩苷和白杨素苷^[7]。6, 7-双乙酰化黄芩素在大鼠血浆中产生 4 种葡萄糖醛酸苷类代谢产物, 初步鉴定为 6-*O*-葡萄糖醛酸黄芩素, 6-*O*-甲基-7-*O*-葡萄糖醛酸黄芩素, 6, 7-*O*-双葡萄糖醛酸黄芩素和 6-*O*-葡萄糖-7-*O*-葡萄糖醛酸黄芩素^[8]。本研究在 ig 葛根芩连颗粒的大肠湿热证大鼠尿液中发现黄芩的代谢产物主要是汉黄芩素与千层纸素 A。

从表 2 可以看出, 葛根芩连颗粒在大肠湿热证大鼠尿液中黄芩与甘草的代谢产物以苷元为主, 葛根中葛根素主要以原形排泄。本研究为阐明葛根芩连汤方治疗大肠湿热证药理作用机制提供了基础。但由于体内代谢成分复杂, 其他代谢产物的结构还需进一步研究确定, 其代谢途径尚需进行深入探讨。

参考文献

[1] 李 学, 魏连波, 罗炳德, 等. 葛根芩连汤对中医大肠

湿热证模型大鼠血清 IL-1、IL-2 和 IL-6 的影响 [J]. 武警医学, 2004, 15(8): 586-588.

[2] 金 慧, 王 彦, 阎 超. 葛根芩连汤入血成分的归属 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(22): 2687-2691.

[3] 陈丽红, 唐于平, 王 强. 葛根芩连汤的现代研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 附 8-附 12.

[4] Chen L H, Wang Q, Liu J N. Simultaneous analysis of nine active components in Gegen Qinlian Preparations by high-performance liquid chromatography with diode array detection [J]. *J Sep Sci*, 2006, 29(14): 2203-2210.

[5] 杨运高, 李智军, 吴仕九, 等. 温病湿热证动物模型研制的方法学比较 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1984, 4(3): 172.

[6] Chen L H, Tang Y P, Chen M J, *et al*. Chemical correlation between Gegen Qinlian dispensing granule and its four raw herbs by LC fingerprint [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17: 100-107.

[7] 李建荣, 左 风, 张 磊, 等. 泻心汤沉淀物代谢产物的研究 I [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(21): 1673-1676.

[8] Hu Y, Guo X Y, Lin Y, *et al*. Metabolites of baicalein 6, 7-diacetate in rats [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2008, 17: 309-313.