

黄连解毒汤的药动学-药效学相关性研究

宋 珏¹, 路 通², 谢 林³, 刘晓东^{3*}

1. 安徽医科大学药学院, 安徽 合肥 230032

2. 中国科学院上海药物研究所 药物代谢研究中心, 上海 201203

3. 中国药科大学 江苏省药物代谢动力学重点实验室, 江苏 南京 210038

摘要: 目的 研究大鼠给予黄连解毒汤 (HJD)、黄芩提取物及黄芩苷后, 血清中黄芩苷和汉黄芩苷的经时变化及抗氧化作用的药动学-药效学 (PK-PD) 相关性。方法 以 HPLC 法同步监测血清黄芩苷、汉黄芩苷的水平, 求算其血药浓度-时间曲线下面积 (AUC), 并将含药血清抗氧化作用的效应-时间曲线下面积 (AUE) 与对应的 AUC 进行相关性分析。结果 HJD、黄芩提取物及黄芩苷的 lgAUC-AUE 均呈近似 “S” 形曲线。结论 HJD、黄芩提取物及黄芩苷的抗氧化作用与血清黄芩苷、汉黄芩苷水平呈正相关, 黄芩苷可能是 HJD 及黄芩抗氧化作用的活性成分, 汉黄芩苷也有一定的抗氧化作用。

关键词: 黄连解毒汤; 黄芩; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 药动学; 药效学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)10-2042-05

Analysis on pharmacokinetics-pharmacodynamics correlation of Huanglian Jiedu Decoction

SONG Yue¹, LU Tong², XIE Lin³, LIU Xiao-dong³

1. College of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

2. DMPK Center, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Science, Shanghai 201203, China

3. Key Laboratory of Drug Metabolism & Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China

Abstract: Objective To study pharmacokinetics-pharmacodynamics (PK-PD) correlation of Huanglian Jiedu Decoction (HJD) through simultaneous determination of baicalin and wogonoside in serum after oral administration of HJD, *Scutellariae Radix* extract, and baicalin to rats. **Methods** The serum concentrations of baicalin and wogonoside were simultaneously detected with an HPLC method and the area under serum concentration-time curve (AUC) was calculated. The correlation between the parameter area under serum effect-time curve (AUE) and AUC was analyzed. **Results** The scatterplots of lg(AUC)-AUE in above three groups were formed as “S-shaped” curves. **Conclusion** The anti-oxidative effects of HJD, *Scutellariae Radix* extract, and baicalin have a positive correlation with baicalin and wogonoside levels in serum. Baicalin may act as one of the anti-oxidants both in *Scutellariae Radix* extract and HJD. Also, wogonoside has anti-oxidative effects to some extent.

Key words: Huanglian Jiedu Decoction (HJD); *Scutellariae Radix*; baicalin; wogonoside; pharmacokinetics (PK); pharmacodynamics (PD)

中药复方成分复杂, 作用广泛, 很难用一种成分、一种效应反映复方的全貌。如能选择合适的效应指标, 同步监测体内可能产生相同效应的多个成分, 并将时间-药效-药物浓度三者结合, 从而建立多成分的药动学 (PK) 和多效应的药效学 (PD) 结合模型, 就能更加准确地评价药物的体内过程以及产生药理作用的动态过程, 较为全面地反映中药复方药动学特征。黄连解毒汤 (Huanglian Jiedu

Decoction, HJD) 为中医清热解毒的经典方, 具有广泛的药理作用与临床用途。近年来, 该方的抗氧化作用受到广泛重视^[1-3], 关于其药动学方面也有研究报道^[4-5], 但关于其 PK-PD 相关性研究尚少。本实验以 HPLC 法, 同步监测 HJD、黄芩及黄芩苷大鼠给药后血清中黄芩苷、汉黄芩苷水平, 以 3 种供试药品的含药血清抗氧化作用为效应指标^[6], 对 HJD 的药动学-药效学 (PK-PD) 关系进行初步探讨。

收稿日期: 2011-01-18

基金项目: 安徽省高等学校青年教师科研资助计划 (2006jq1106); 安徽医科大学校科研基金 (2006kj19)

作者简介: 宋 珏 (1979—), 女, 安徽芜湖人, 安徽医科大学药理学教研室讲师, 博士, 主要从事生物药剂学与药动学研究。

Tel: (0551)5161115 Fax: (0551)5161116 E-mail: bao712@126.com

*通讯作者 刘晓东 Tel: (025)83271006 E-mail: xdlou1960@hotmail.com

1 材料

1.1 动物

SD大鼠, 雄性, 体质量250~280 g, 上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 合格证号: SCXK(沪)2003-0002。

1.2 药品与试剂

黄连、黄芩、黄柏、栀子均购自南京药业股份有限公司药材分公司, 并经中国药科大学生药学陈立娜博士鉴定。

黄芩苷对照品购自中国药品生物制品检验所, 汉黄芩苷对照品为中国中医研究院中药研究所刘美兰教授惠赠, 质量分数>98%。试剂均为分析纯, 水为超纯水。

1.3 仪器

岛津LC-2010 CHT高效液相色谱仪, 配有低压梯度四元泵、紫外检测器及CLASS-VP色谱工作站。Milli-Q Gradient A10超纯水器(Millipore Inc, 美国)。

2 方法^[7]

2.1 色谱条件

Shim-pack ODS 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。流动相0.05%磷酸+5 mmol/L NaH₂PO₄ (A)-乙腈(B), 梯度洗脱, 0~16 min, 74.5% A; 16~19.5 min, 55% A; 19.5~21.5 min, 74.5% A; 21.5~26 min, 平衡色谱柱; 体积流量1.5 mL/min; 检测波长276 nm; 柱温40 ℃。

2.2 样品制备

黄连、黄芩、黄柏、栀子按古方质量比例3:2:2:3混合, 加10倍量水浸泡1 h, 加热煮沸后文火煎煮1 h, 趁热滤过。同法再煎煮2次, 合并3次滤液, 加热浓缩成浸膏, 100 ℃烘干, 研磨成粉, 冷藏保存, 所得提取物粉末(HJD)相当于生药4.57 g/g。同法制得黄芩提取物, 相当于生药3.75 g/g。经HPLC法分析, 黄芩提取物中含黄芩苷160 mg/g, HJD中含黄芩苷40 mg/g。黄芩苷, 自行制备, 质量分数80%。

2.3 含药血清的制备

大鼠12只, 随机分3组, 每组4只。禁食12 h后3组大鼠分别给予HJD 5.13 g/kg、黄芩提取物1.25 g/kg及黄芩苷(自制)250 mg/kg, 各样品以黄芩苷剂量相当, 各样品以0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)混悬液为溶媒。分别于给药前和给药后5、15、30 min及1、2、3、4、6、8、10、12 h眼

球取血, 3 000 r/min离心10 min, 分离血清, 备用。

2.4 血清样品的处理

取血清0.1 mL, 加入1 mmol/L KH₂PO₄溶液50 μL, 振荡混匀, 加入甲醇-乙腈(1:1)溶液100 μL涡漩10 min, 两次离心(18 000 r/min), 每次10 min, 取20 μL进样分析。

2.5 含药血清对PC12细胞保护作用的药效学研究^[6]

将PC12细胞悬液以1×10⁵/mL浓度接种于96孔培养板中, 培养至细胞长满单层, D-Hank's液洗2次, 每孔加入DMEM培养液100 μL, 各组分别加入经0.22 μm滤膜滤过灭菌的相应含药血清, 终体积分数为5%, 每组设6复孔。将样品分为14组: 空白血清对照组(1), 模型组(2), 给药后5、15、30 min及1、2、3、4、6、8、10、12 h的含药血清组(3~13), 尼莫地平组(14)。第1、2组加入含5%空白血清的培养液, 第14组加入终浓度为5×10⁻⁶ mol/L尼莫地平, 第3~13组分别加入各相应时间点的5%含药血清; 第2~14组每孔加入终浓度为2 mmol/L的H₂O₂造模。37 ℃、5% CO₂培养3 h。弃去培养液, D-Hank's液洗涤2次, 加入无血清DMEM培养16 h。MTT法测定细胞活力, 计算含药血清对PC12细胞的保护率。

$$\text{保护率} = (A_{\text{含药血清}} - A_{\text{模型}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{模型}})$$

2.6 统计学方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 相关参数以Excel软件处理。

3 结果

3.1 方法学验证

在本实验条件下, 黄芩苷、汉黄芩苷及其3种未知结构代谢物均有较强的色谱峰和较好的分离度, 血浆杂质不干扰样品的测定, 基线噪音小, 黄芩苷、汉黄芩苷的保留时间分别为8.28、17.1 min, 见图1。

取空白血浆0.1 mL, 精密加入10 μL不同浓度的黄芩苷、汉黄芩苷对照品, 使黄芩苷质量浓度分别为0.156、0.312、0.625、1.25、2.5、5、10 μg/mL, 汉黄芩苷质量浓度分别为0.109、0.218、0.437、0.875、1.75、3.5、7 μg/mL。按“2.3”项方法操作。以样品的质量浓度(X)对样品峰面积(Y)作线性回归。黄芩苷回归方程 $Y=17\,591 X-2\,067$ ($r=0.999\,2$, $n=5$); 汉黄芩苷回归方程 $Y=22\,827 X+458$ ($r=0.999\,9$, $n=5$)。

3.2 黄芩苷及汉黄芩苷的药理学

大鼠ig给予HJD、黄芩提取物及黄芩苷后, 血清

中黄芩苷及汉黄芩苷血药浓度-时间曲线见图 2。

3.3 含药血清对 PC12 细胞的保护作用

MTT 法测得各供试样品对 PC12 细胞的保护率, 效应-时间曲线见图 3。

3.4 血药浓度-时间曲线、效应-时间曲线的相关性分析

比较各含药血清组的效应-时间曲线与黄芩苷

血药浓度-时间曲线, 发现给药后 0~1 h 内, 各组效应-时间曲线和血药浓度-时间曲线均达峰值; 2~4 h 效应-时间曲线达到第 2 个峰值, 但血药浓度-时间曲线中黄芩苷的量较低; 4 h 后, 血药浓度-时间曲线中黄芩苷的量达到第 2 个峰值, 效应也相应增加, 但保护率低于第 1 个效应峰。

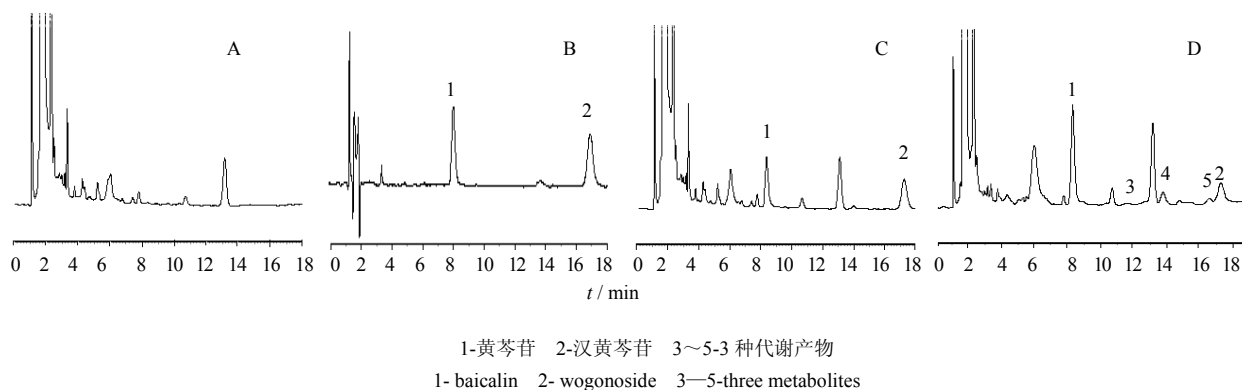


图 1 大鼠空白血清 (A)、黄芩苷和汉黄芩苷对照品 (B)、空白血清+黄芩苷、汉黄芩苷对照品 (C) 和给予 HJD 后 10 min 血清样品 (D) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of rat blank serum (A), baicalin and wogonoside reference substances (B), blank serum spiked with baicalin and wogonoside (C), and sample of 10 min after oral administration of HJD (D)

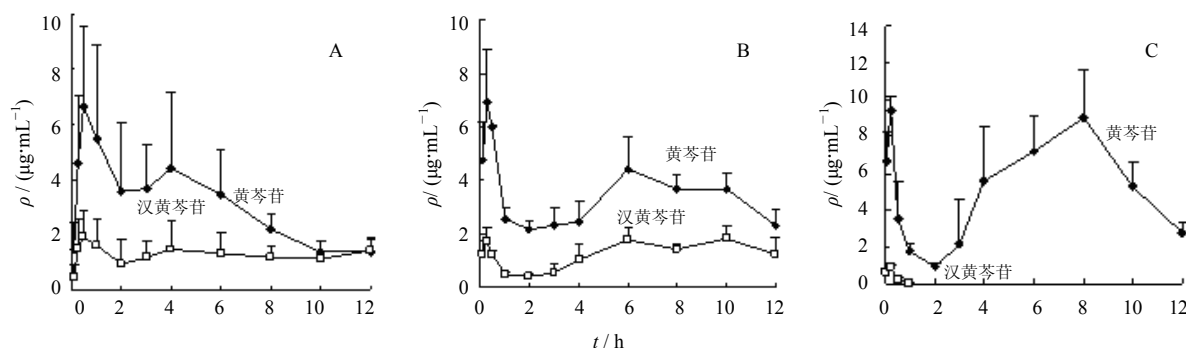


图 2 HJD (A)、黄芩提取物 (B) 和黄芩苷 (C) ig 给药后大鼠血清中黄芩苷、汉黄芩苷血药浓度-时间曲线 (n=4)

Fig. 2 Serum concentration-time curves of baicalin and wogonoside after ig administration of HJD (A), *Scutellariae Radix* extract (B), and baicalin (C) in rats (n=4)

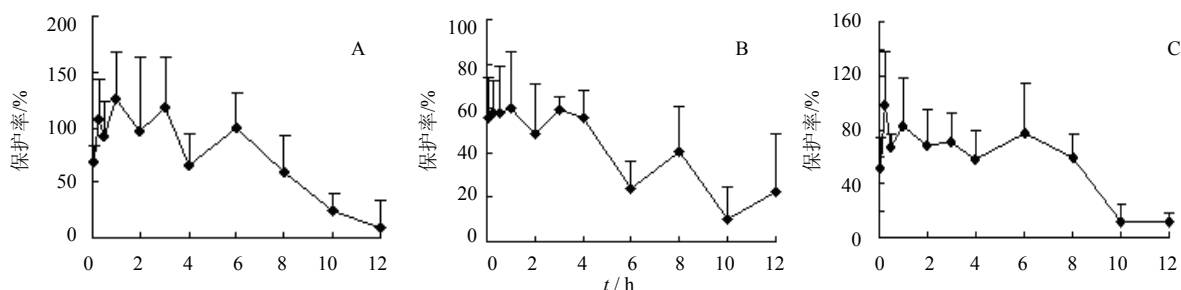


图 3 HJD (A)、黄芩提取物 (B) 和黄芩苷 (C) ig 给药后含药血清对 H₂O₂ 介导的 PC12 细胞损伤的效应-时间曲线 (n=4)

Fig. 3 Serum effect-time curves of protection rate of herb-contained serum against H₂O₂-induced cell damage in PC12 cells after ig administration of HJD (A), *Scutellariae Radix* extract (B), and baicalin (C) (n=4)

由 HJD 抗氧化作用的效应-时间曲线及血清中黄芩苷、汉黄芩苷的血药浓度-时间曲线, 分别求算效应-时间曲线下面积 (AUE) 及血药浓度-时间曲线下面积 (AUC)。以 AUC 的对数值为横坐标, AUE 为纵坐标作图, 得 $\lg AUC$ -AUE 曲线近似“S”

形, 表明 HJD 的抗氧化作用与黄芩苷、汉黄芩苷的量呈正相关。将这 2 个成分的 AUC 简单叠加, 其与 HJD 的 AUE 亦呈正相关, 见图 4。同法可知黄芩提取物及黄芩苷的抗氧化作用也与血清中黄芩苷、汉黄芩苷浓度呈正相关。结果见图 5、6。

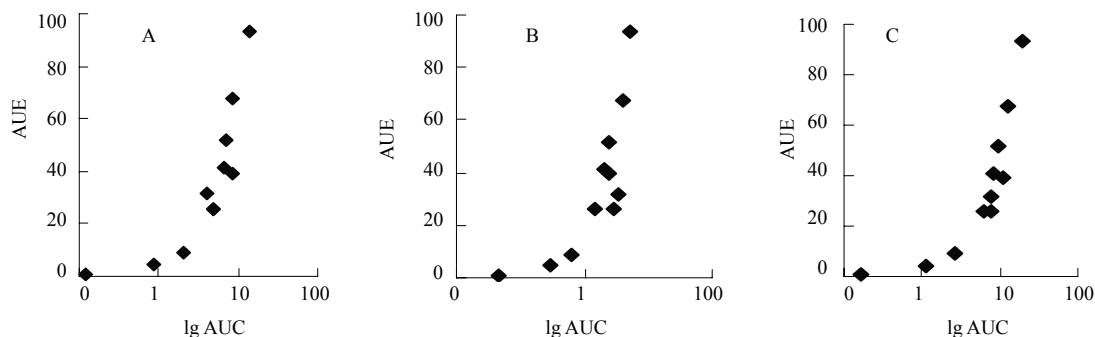


图 4 黄芩苷 (A)、汉黄芩苷 (B)、黄芩苷+汉黄芩苷 (C) 的质量浓度与 HJD 含药血清保护率之间的相关性拟合 ($n=4$)

Fig. 4 Correlation between baicalin (A), wogonoside (B), and baicalin + wogonoside (C) concentrations and protection rate of herb-contained serum in HJD ($n=4$)

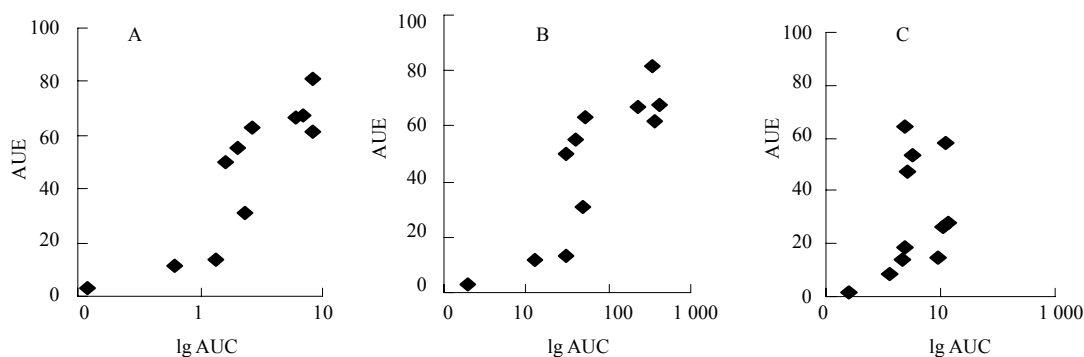


图 5 黄芩苷 (A)、汉黄芩苷 (B)、黄芩苷+汉黄芩苷 (C) 的质量浓度与黄芩提取物含药血清保护率之间的相关性拟合 ($n=4$)

Fig. 5 Correlation between baicalin (A), wogonoside (B), and baicalin + wogonoside (C) concentrations and protection rate of herb-contained serum in *Scutellariae Radix* extract ($n=4$)

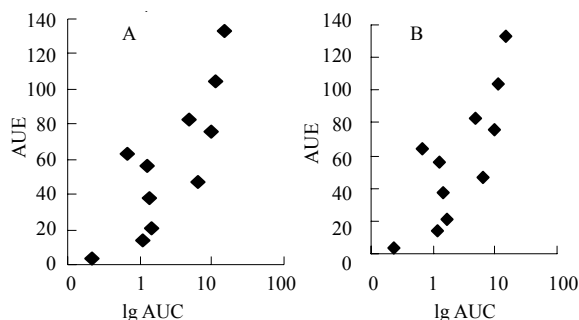


图 6 黄芩苷 (A)、黄芩苷+汉黄芩苷 (B) 的质量浓度与黄芩苷含药血清保护率之间的相关性拟合 ($n=4$)

Fig. 6 Correlation between baicalin (A) and baicalin + wogonoside (B) concentrations and protection rate of herb-contained serum in baicalin ($n=4$)

4 讨论

HJD 具有良好的抗氧化作用^[1-3], 其中黄芩的抗氧化作用尤其受到关注和研究^[8]。已证实黄芩对酶促及非酶促两种途径生成过氧化脂质的过程均有显著抑制作用。黄芩中的活性成分黄芩苷及其苷元黄芩素、汉黄芩苷及其苷元汉黄芩素对大鼠大脑皮质线粒体氧化损伤均有保护作用^[2], 结构中的 2、3 位双键、4 位羰基及 3 或 5 位羟基可能是其清除自由基、抗氧化作用的活性基团^[3]。故本实验以抗氧化作用作为 HJD 的代表性效应指标, 同步监测 HJD 中主要抗氧化组分黄芩中的黄芩苷、汉黄芩苷, 分析其量-效关系。

结果表明, HJD、黄芩提取物、黄芩苷 3 组含

药血清的抗氧化作用的 AUE 与各含药血清中黄芩苷量的 AUC 呈正相关,提示黄芩苷可能是黄芩、乃至 HJD 抗氧化作用的主要成分。在 0~1 h 内,效应-时间曲线与黄芩苷血药浓度-时间曲线平行上升同步达峰,提示黄芩苷可能与该效应峰的产生有关。2~4 h,黄芩苷的量偏低,而各含药血清组抗氧化作用反出现峰值,包括黄芩苷组也如此,提示给药后体内可能产生了具抗氧化活性的黄芩苷代谢物,或被黄芩苷激活的自身活性物质。该时间段的效应峰可能是这些物质与黄芩苷共同作用的结果。在本实验中给药 4 h 后,血清黄芩苷水平达第 2 个峰,效应有所增加,但低于相同浓度下的第 1 个效应峰,提示第 1 效应峰可能也有其他物质参与。前期研究证实^[4],黄芩的含药血清经灭活后,2~4 h 时的效应峰值消失,也说明了黄芩含药血清的这一效应峰可能是其他物质产生的,血清灭活后这些物质活性降低,从而降低了其抗氧化作用。

比较图 4、5、6 可见,3 个给药组中以 HJD 组的图形最接近“S”,说明全方的相关性最高。虽然全方 AUC 较黄芩苷组 AUC 有所降低,但全方的抗氧化效应却一直保持较高水平,提示全方可能存在黄芩苷以外的抗氧化活性成分。证实该方配伍的合理性。

汉黄芩苷也具有抗氧化作用^[9]。本实验结果表明,ig 给予 HJD、黄芩后,血清中汉黄芩苷的量与含药血清的抗氧化作用呈正相关,IgAUC-AUE 曲线近似“S”形。将黄芩苷、汉黄芩苷质量浓度简单叠加,两者质量浓度之和的 IgAUC 与 AUE 也呈近似“S”形曲线,即两者亦呈正相关。黄芩苷、汉黄芩苷可能均为 HJD 及黄芩提取物中抗氧化活

性成分,只是汉黄芩苷血清浓度较低,对抗氧化作用的贡献小于黄芩苷的贡献。

参考文献

- [1] Kimura Y, Okuda H, Taira Z, *et al.* Studies on *Scutellariae Radix* IX: New component inhibiting lipid peroxidation in rat liver [J]. *Planta Med*, 1984, 51(4): 290-295.
- [2] 高中洪, 黄开勋, 卞曙光, 等. 黄芩黄酮对自由基引起的大鼠脑线粒体损伤的保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2000, 16(1): 81-83.
- [3] Gao Z H, Xu H B, Chen X J, *et al.* Antioxidant status and mineral contents in tissues of rutin and baicalin fed rats [J]. *Life Sci*, 2003, 73: 1599-1607.
- [4] 宋 珏, 路 通, 谢 林, 等. 以血清药理学方法研究黄连解毒汤对小鼠的药效动力学 [J]. 中草药, 2005, 36(5): 709-713.
- [5] 邓远雄, 杨昌华, 牟玲丽. 黄连解毒汤中黄芩苷和汉黄芩苷在糖尿病大鼠体内的药动学 [J]. 中草药, 2008, 39(2): 227-231.
- [6] 宋 珏, 路 通, 谢 林, 等. 黄连解毒汤抗氧化作用的血清药理学研究 [J]. 中国实验方剂学, 2010, 16(4): 118-122.
- [7] 路 通, 宋 珏, 谢 林, 等. HPLC 法同时测定灌胃黄芩水煎剂后大鼠血浆中黄芩苷和汉黄芩苷的质量浓度及药动学研究 [J]. 中草药, 2005, 36(6): 870-873.
- [8] Kimura Y, Okuda H, Tani T, *et al.* Studies on *Scutellariae Radix* VI: Effects of flavanone compounds on lipid peroxidation in rat liver [J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30(5): 1792-1795.
- [9] Yokozawa T, Ishida A, Kashiwada Y, *et al.* *Coptidis Rhizoma*: protective effects against peroxynitrite-induced oxidative damage and elucidation of its active components [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2004, 56: 547-556.