

葛根芩连汤中葛根和甘草对黄芩有效成分在大鼠肝代谢的影响

张伯莎, 安 骥*, 张艺竹, 蔡巧玲, 王 跃, 王新宏

上海中医药大学, 上海 201203

摘要: **目的** 研究葛根芩连汤中葛根和甘草对黄芩有效成分黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素在大鼠肝微粒体代谢的影响, 探讨该复方配伍机制。**方法** 采用在体诱导-体外肝微粒体温孵方法, 分别考察葛根芩连汤中葛根、甘草对黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素在大鼠肝微粒体中代谢的影响, 利用超高效液相色谱(UPLC)法测定大鼠肝微粒体中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的量。**结果** 温孵时间黄芩苷在 0~90 min, 汉黄芩苷在 0~60 min, 黄芩素在 0~10 min, 汉黄芩素在 0~40 min 呈线性消除。对照组各成分代谢速率大小顺序为: 黄芩素>汉黄芩素>汉黄芩苷>黄芩苷。与对照组相比, 葛根对汉黄芩苷、黄芩素的代谢具有抑制作用, 对黄芩苷及汉黄芩素的代谢具有诱导作用; 甘草对汉黄芩素的代谢具抑制作用, 对黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素的代谢则呈现诱导作用。**结论** 黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素可以被大鼠肝微粒体代谢, 葛根芩连汤中葛根、甘草对黄芩有效成分的代谢过程有影响。

关键词: 葛根芩连汤; 葛根; 甘草; 黄芩; 肝代谢

中图分类号: R289.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)11-2227-05

Effects of *Puerariae Lobatae Radix* and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* in Gegen Qinlian Decoction on rat liver metabolism of active ingredients in *Scutellaria Radix*

ZHANG Bo-sha, AN Rui, ZHANG Yi-zhu, CAI Qiao-ling, WANG Yue, WANG Xin-hong

Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: **Objective** To study the effects of *Puerariae Lobatae Radix* (PLR) and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (GRR) in Gegen Qinlian Decoction (GQD) on the rat liver microsome metabolism of baicalin, wogonoside, baicalein, and wogonin in *Scutellariae Radix* (SR) and to explore the compatibility mechanism of the constituents. **Methods** The effects of various medicinal materials in GQD, such as PLR and GRR on the rat liver microsomes metabolic activities of baicalin, wogonoside, baicalein, and wogonin were investigated by *in vivo* induced-*in vitro* liver microsomes incubation method. UPLC method was developed for the determination of baicalin, wogonoside, baicalein, and wogonin in the rat liver microsomes incubation system. **Results** Baicalin, wogonoside, baicalein, and wogonin were linear to be eliminated within 90, 60, 10, and 40 min, respectively. In the control group, the order of metabolic rate for each ingredient was baicalein > wogonin > wogonoside > baicalin. Compared with the control group, PLR showed the metabolic inhibition on wogonoside and baicalein, but the metabolic induction on baicalin and wogonin; GRR showed the metabolic inhibition on wogonin, but the metabolic induction on baicalin, wogonoside, and baicalein. **Conclusion** Baicalin, wogonoside, baicalein, and wogonin could be metabolized in rat liver microsomes. PLR and GRR in GQD could affect the metabolic process of the active ingredients in SR.

Key words: Gegen Qinlian Decoction (GQD); *Puerariae Lobatae Radix* (PLR); *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (GRR); *Scutellaria Radix* (SR); active ingredients; liver metabolism

葛根芩连汤出自《伤寒论·太阳篇》, 方中重用葛根为君, 既可解肌表之热, 又能升发脾胃清阳之气而止痢; 黄芩、黄连为臣, 性味苦寒, 善清里热, 厚肠胃而治痢; 炙甘草甘缓和中, 并协调诸药为使^[1]。

目前, 对于此方的研究多集中在某些单一成分的体内过程及药理研究上^[2-5], 有关其配伍组分体内代谢相互作用方面研究报道较少。本课题组在前期研究基础上^[6-7], 分析葛根芩连汤全方及不同配伍组的药

收稿日期: 2012-02-27

基金项目: 上海市自然科学基金面上项目(12ZR1431500); 上海市教育委员会科研创新面上项目(11YZ69); 上海市教育委员会科研创新重点项目(11ZZ110); 高等学校博士点专项科研基金(20093107110011)

作者简介: 张伯莎(1986—), 女, 研究生, 研究方向为药物分析与中药体内过程。Tel: (021)51322450 E-mail: zhangbosha1986@yahoo.com.cn

***通讯作者** 安 骥 Tel: (021)51322183 E-mail: anruimw@126.com

动力学和药效学差异,发现复方中葛根、甘草对黄芩的吸收及代谢可能存在相互作用。本实验采用在体诱导-体外肝微粒体温孵的方法研究葛根芩连汤中葛根、甘草对黄芩中主要活性成分黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素肝脏代谢的影响,以期探讨葛根芩连汤的配伍机制提供实验依据。

1 材料

1.1 药材与试剂

葛根(批号 090525),购自上海康桥中药饮片有限公司,炙甘草(批号 090323),购自上海金桥养和堂药店,上述药材经上海虹桥饮片厂陈燕军主管药师鉴定,符合《中国药典》2010 年版一部规定。黄芩苷(批号 110715-200815)、黄芩素(批号 111595-200905)、汉黄芩素(批号 111514-200403)对照品,均购自中国药品生物制品检定所,汉黄芩苷(批号 090203)对照品,购自上海融禾医药科技有限公司。还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH),美国 Sigma 公司;磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、氯化镁、生理盐水、甘油,均购自国药集团化学试剂有限公司;考马斯亮蓝试剂盒,南京建成生物工程研究所;甲醇、乙腈,色谱级,德国 Merck 公司;其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.2 仪器

Acquity UPLC™ H-Class 超高效液相色谱仪-二极管阵列(PDA)、Empower 色谱工作站, Waters 公司;UV765 紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;Centrifuge MR 231 高速离心机,美国 Thermo 公司;Optima™ LE-80K 超高速离心机,美国 Beckman 公司;FJ-200 高速分散均质机,上海标本模型厂;KW-1000 DB 双功能水浴恒温振荡器,金坛市科析仪器有限公司;QT-1 涡旋混合器,上海琪特分析仪器有限公司;AL104 电子天平,梅特勒-托利多仪器上海有限公司。

1.3 动物

雄性 SD 大鼠,清洁级,体质量 200~250 g,上海中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(2003-0002)。

2 方法

2.1 药液制备

分别取葛根、甘草饮片适量,加 8 倍量水煎煮 2 次。葛根煎煮时间分别为 50、30 min,甘草煎煮时间均为 30 min,滤过,合并 2 次滤液,分别浓缩至 1 g/mL,备用。

2.2 分组与给药

18 只大鼠随机分为 3 组,葛根组、甘草组和对照组,每组 6 只。葛根组、甘草组每日清晨空腹 ig 给予相应药材水煎液 1 次,剂量分别为 5.8、2.3 g/kg,连续给药 7 d,对照组给予等量的生理盐水。

2.3 肝微粒体制备

大鼠末次给药后禁食 24 h(自由饮水),次日颈椎脱臼处死,尽量放出血液,迅速打开腹腔用冰冷生理盐水经门静脉灌洗肝脏至土黄色,滤纸吸尽肝脏表面水分后称质量。将肝脏立即放入磷酸盐缓冲溶液中,剪碎,洗净血污至无色。每克肝组织加入 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 3 mL 制成匀浆液,超声分散 30 s,收集匀浆液,4 ℃下 $10\,000\times g$ 离心 20 min,上清液用 4 层纱布滤过以除去漂浮脂类物,滤液再于 4 ℃下 $105\,000\times g$ 离心 60 min,弃上清液,沉淀用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)(质量/体积比为 1:1)悬浮均匀,沉淀即为肝微粒体。最后用 0.1 mol/L 含 20%甘油的磷酸盐缓冲液(pH 7.4)重悬(1:1),分装后于-80 ℃冷冻保存。用考马斯亮蓝法测定肝微粒体的蛋白浓度^[8]。

2.4 对黄芩有效成分在肝微粒体中代谢的影响

反应体系中分别含葛根组、甘草组和对照组肝微粒体蛋白 0.5 mg/mL、NADPH 1 mmol/L、MgCl₂ 5 mmol/L、K₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液体系 0.1 mol/L(pH 7.4),及用甲醇配制的不同浓度的黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品溶液,反应体系中甲醇终体积分数<1%。反应体系在 37 ℃水浴中温孵振荡,定时取样,冰冷乙腈 400 μL 终止反应,经处理后在确定条件下分析。

2.5 肝微粒体中黄芩有效成分 UPLC 法测定

2.5.1 供试品溶液的制备 取经乙腈终止反应后的样品,涡旋混匀 3 min,于 8 000 r/min 离心 10 min,上清液备用,按确定色谱条件进样分析。

2.5.2 对照品溶液的制备 分别精密称取黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品适量,用甲醇溶解,制成质量浓度分别为 0.418、0.415、0.412、0.420 mg/mL 的对照品贮备液。

2.5.3 色谱条件 色谱柱为 Agilent Proshell 120 EC-C₁₈ 柱(50 mm×4.6 mm, 2.7 μm),流动相为 0.2%乙酸水溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱。洗脱条件:黄芩苷、汉黄芩苷,0~3 min,45%~53%B;黄芩素,0~2 min,51%~65%B;汉黄芩素 0~3 min,51%~84%B;体积流量 1 mL/min。柱温为室温。紫外检测波长 280 nm。

2.5.4 专属性考察 在色谱条件下, 本方法专属性良好, 无内源性杂质干扰。色谱图见 1。

2.5.5 线性关系考察 精密称取各成分对照品溶液, 加入大鼠空白肝微粒体, 并用基础磷酸盐缓冲液稀释, 配制一系列质量浓度的黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素, 进样测定。以各对照品质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y),

绘制标准曲线, 得线性方程 $Y=7\,328.8\,X-746.32$ (黄芩苷), $Y=11\,507\,X-1\,577.9$ (汉黄芩苷), $Y=10\,793\,X+1\,136.2$ (黄芩素), $Y=4\,436.4\,X-185.73$ (汉黄芩素), r 依次为 0.999 9 (线性范围 0.083 7~16.73 $\mu\text{g/mL}$)、0.999 8 (线性范围 0.083~16.6 $\mu\text{g/mL}$)、0.999 9 (线性范围 0.082 3~16.47 $\mu\text{g/mL}$)、0.999 8 (线性范围 0.084~16.8 $\mu\text{g/mL}$)。

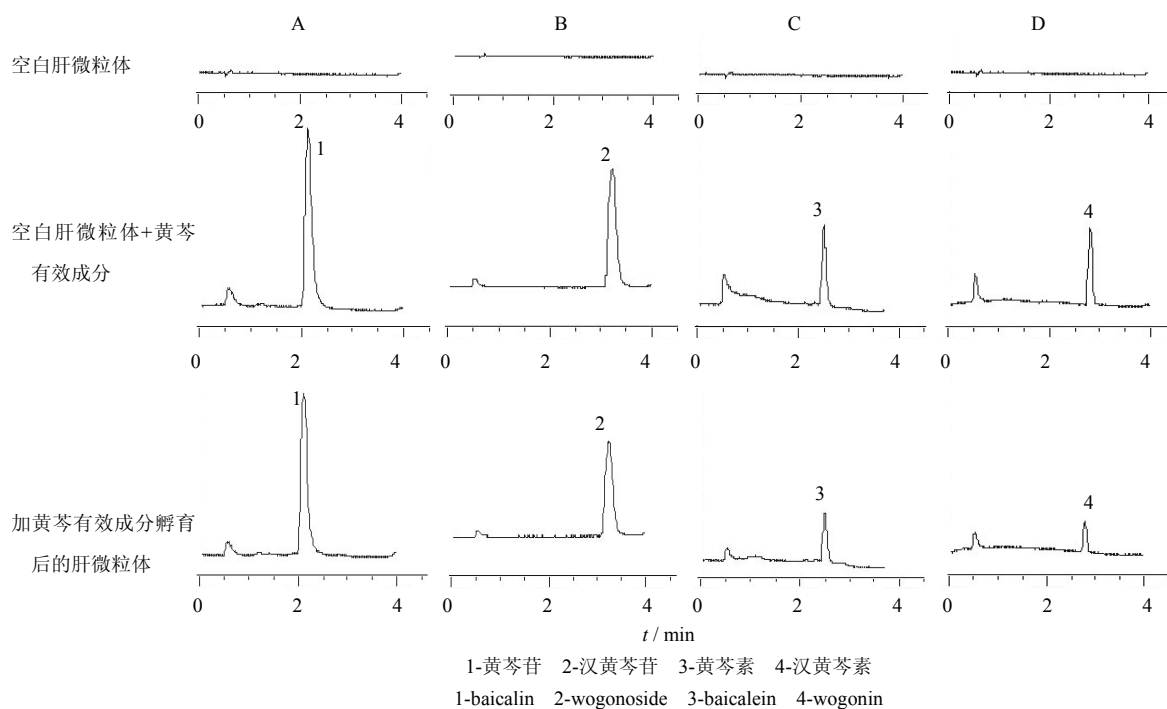


图 1 空白肝微粒体、空白肝微粒体+黄芩有效成分、加黄芩有效成分孵育后的肝微粒体中黄芩苷 (A)、汉黄芩苷 (B)、黄芩素 (C)、汉黄芩素 (D) 的 UPLC 图

Fig. 1 UPLC chromatograms of baicalin (A), wogonoside (B), baicalein (C), and wogonin (D) in blank liver microsomes, blank liver microsomes+active ingredients of SR, and liver microsomes incubated by active ingredients of SR

2.5.6 精密度试验 在肝微粒体孵育液中加入各成分对照品溶液, 按确定步骤进行操作, 在色谱条件下考察日内精密度、日间精密度, 结果各成分日内和日间精密度 RSD 均小于 2.0%, 表明仪器精密度良好。

2.5.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 各测定 1 次, 计算各成分峰面积的 RSD 均小于 2.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.8 方法回收率试验 配制含已知量的各成分对照品溶液的肝微粒体样品各 6 份, 按确定的步骤及条件进行样品处理并测定, 计算回收率。结果黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素回收率均在 94.56%~98.03%, RSD 均小于 2.0%, 符合生物样品分析要求。

2.6 数据分析

根据体外肝微粒体实验所测得药物浓度与药物代谢速度做 Lineweaver-Burk 双倒数曲线, 其截距的倒数即为最大代谢速率 ($V_{\max}$), 斜率与 $V_{\max}$ 的乘积即为米氏常数 (K_m), 根据以上表观酶促动力学参数确定最佳孵育浓度。

3 结果

3.1 黄芩有效成分在大鼠肝微粒体中代谢酶动力学

3.1.1 温孵时间对有效成分代谢的影响 取大鼠空白肝微粒体 6 份, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 解冻, 按“2.4”项下方法操作, 使体系中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的质量浓度分别为 5、10、5、5 $\mu\text{g/mL}$, 分别在 0、10、20、40、60、90 min 终止反应, 按“2.5”项方法处理和测定, 计算各时间点孵育体系的药物

剩余量。结果表明,黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素分别在 0~90、0~60、0~10、0~40 min 内呈线性消除,确定其最佳孵育时间依次为 90、60、10、40 min。结果见图 2。

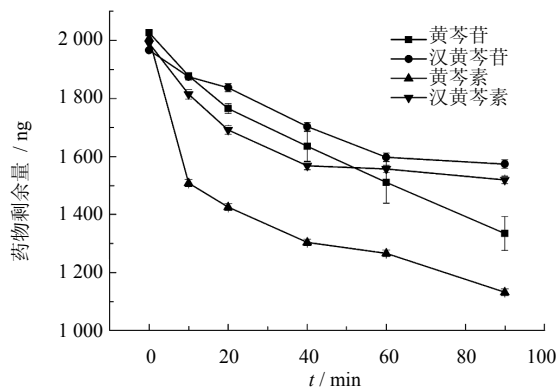


图 2 温孵时间对黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素代谢的影响

Fig. 2 Effects of incubation time on metabolism of baicalin, wogonoside, baicalein, and wogonin

表 1 黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的表观酶促动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Apparent enzyme kinetics parameters of baicalin, wogonoside, baicalein, and wogonin ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	单位	黄芩苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素
K_m	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.43 ± 0.07	19.43 ± 2.69	6.40 ± 0.65	8.40 ± 0.37
$V_{\max}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	119.53 ± 1.19	67.29 ± 3.76	37.91 ± 2.60	178.14 ± 4.71

表 2 葛根、甘草对黄芩主要有效成分在大鼠肝微粒体代谢的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effects of PLR and GRR on rat liver microsome metabolism of active ingredients in SR ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	$V / (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$			
	黄芩苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素
对照	8.09 ± 1.00	39.34 ± 2.71	205.06 ± 9.20	201.67 ± 4.29
葛根	$19.12 \pm 1.07^{**}$	$30.03 \pm 2.41^{**}$	$131.73 \pm 9.45^{**}$	$209.80 \pm 0.90^{**}$
甘草	$62.81 \pm 2.08^{**}$	$99.61 \pm 2.16^{**}$	$330.98 \pm 9.21^{**}$	$192.33 \pm 2.06^{**}$

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$

$^{**}P < 0.01$ vs control group

4 讨论

本研究采用 UPLC 法实现了对样品的快速准确检测^[9]。在大鼠肝微粒体对黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素代谢的酶动力学研究中,综合蛋白质质量浓度对样品的干扰以及 NADPH 的消耗等因素,确定肝微粒体孵育实验的蛋白质质量浓度为 0.5 mg/mL。当黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素在大鼠肝微粒体孵育体系中的温孵时间分别为 90、60、10、40 min 时,各成分呈时间相关性线性消除,之后其代谢速率逐渐减慢。当底物黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的质量浓度依次大于 5、10、

3.1.2 肝微粒体酶对不同浓度有效成分的代谢 向孵化缓冲液体系(含 MgCl_2 的磷酸盐缓冲液) 200 μL 中加入微粒体蛋白 0.5 mg/mL 和质量浓度为 0.5~50 $\mu\text{g/mL}$ 黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素对照品溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 预孵育 5 min 后加入 NADPH 启动反应, 4 种成分分别孵育振荡 90、60、10、40 min 后, 加入乙腈 400 μL 终止反应, 按“2.4”项处理和测定后, 计算各时间点孵育体系的药物代谢速率(V), 计算各成分的表观酶促动力学参数 K_m 及 $V_{\max}$ 。结果见表 1。
3.2 葛根、甘草对大鼠肝微粒体中黄芩有效成分代谢的影响

向孵化缓冲液体系中加入黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素, 使它们的质量浓度分别为 5、10、5、5 $\mu\text{g/mL}$ 。同时分别加入对照组、葛根组和甘草组大鼠的微粒体蛋白 0.5 mg/mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 预孵育 5 min, NADPH 启动反应。在孵育确定的时间后, 加入乙腈 400 μL 终止反应, 计算各时间点孵育体系中各成分的 V , 将 3 组结果进行比较分析, 结果见表 2、图 3。

5、5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其代谢速率随底物质量浓度的增加而趋缓, 表现出饱和特性, 因此综合分析确定 4 个有效成分在大鼠肝微粒体中孵育条件为: 微粒体蛋白质量浓度均为 0.5 mg/mL, 底物浓度依次为 5、10、5、5 $\mu\text{g/mL}$, 温孵时间依次为 90、60、10、40 min。

配伍是中药方剂发挥药效的关键, 不同的配伍方式与其药效成分的体内代谢特征之间存在一定的对应关系, 这种关系对阐明方剂配伍的科学内涵有重要帮助^[10]。本课题组对葛根芩连汤全方及其不同配伍的药理学及药效学进行研究时发现, 葛根芩连汤全方及不同配伍各成分在血液中的药理学参数各有

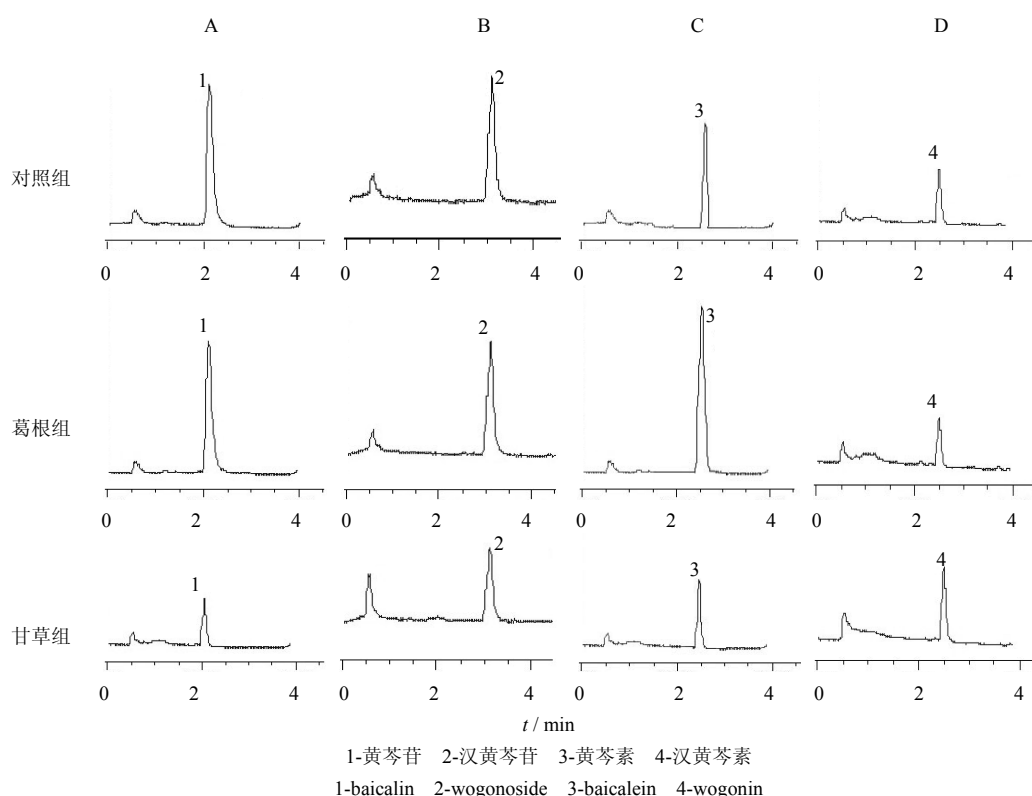


图 3 葛根、甘草对黄芩苷 (A)、汉黄芩苷 (B)、黄芩素 (C)、汉黄芩素 (D) 在大鼠肝微粒体代谢的影响

Fig. 3 Effects of PLR and GRR on rat liver microsome metabolism of baicalin (A), wogonoside (B), baicalein (C), and wogonin (D)

不同, 胃肠吸收也存在差异, 并从 Caco-2 细胞、P-糖蛋白等方面初步分析了造成以上差异的原因, 推测葛根及甘草可能具有提高黄芩有效成分血药浓度的作用, 推测这两味中药可能抑制了黄芩中某些成分的肝脏代谢 (将另文发表)。因此, 本实验对葛根芩连汤中葛根、甘草对黄芩中药效成分黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素在体内代谢的影响进行研究。结果表明, 葛根对汉黄芩苷及黄芩素肝脏代谢具有抑制作用, 甘草对于汉黄芩素肝脏代谢也具有抑制作用; 葛根对黄芩苷、汉黄芩素肝脏代谢具有诱导作用, 甘草对黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素肝脏代谢也具有诱导作用, 与预期的推测不同。原因可能是本研究中葛根、甘草对黄芩药材中的上述 4 种成分体内代谢的影响仅是葛根芩连汤体内过程研究中肝脏 I 相代谢的部分内容, 尚不能全面反映葛根、甘草对黄芩药效成分肝脏代谢的影响。所以, 本课题组还将从整体、细胞、亚细胞等水平对该方的吸收、分布、代谢、排泄环节进行多方位的深入研究, 以期能全面探讨葛根芩连汤的配伍机制。

参考文献

[1] 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.

[2] Nathalie B, Stephanie S, Daniel A, *et al.* Effect of efavirenz on intestinal *p*-glycoprotein and hepatic P450 function in rats [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2005, 8(2): 226-234.

[3] 李 昊, 孙建国, 谢海棠. 大鼠肠管外翻模型对人参皂苷 Rg₁ 吸收机制的研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(5): 510.

[4] Cornaire G, Woodley J F, Saivin S, *et al.* Effect of polyoxyl 35 castor oil and polysorbate 80 on the intestinal absorption of digoxin *in vitro* [J]. *Arzneimittelforschung*, 2000, 50(6): 576-579.

[5] Braun A, Hämmerle S, Suda K, *et al.* Cell cultures as tools in biopharmacy [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 11(Suppl 2): 51-60.

[6] 张 华, 安 骞, 徐冉驰, 等. 葛根芩连汤及不同配伍组中生物碱类成分的肠外翻吸收研究 [J]. 中成药, 2012, 34(4): 620-625.

[7] 张 华, 安 骞, 徐冉驰, 等. 葛根芩连汤及不同配伍组中黄酮类成分的肠外翻吸收研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(23): 3332-3337.

[8] 李 娟, 张耀庭, 曾 伟, 等. 应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量 [J]. 中国生物制品学杂志, 2000, 13(2): 118-120.

[9] 陈 佳, 王钢力, 姚令文, 等. 超高效液相色谱 (UPLC) 在药物分析领域的应用 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(11): 1976-1981.

[10] 冯年平, 都广礼, 狄 斌. 试论中药方剂配伍-代谢关系 [J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(10): 6-9.