

黄芩提取物对细胞色素 P450 酶的影响

姚珏成^{1,2}, 倪健^{1*}, 韩婧¹, 冯丽君¹, 闫磊¹

(1. 北京中医药大学, 北京 100102; 2. 北京市药品监督管理局海淀分局, 北京 100097)

〔摘要〕 目的:研究黄芩提取物对大鼠细胞色素 P450 同工酶 CYP1A2, CYP3A4, CYP2E1, CYP2C19 活性的影响。方法:建立同时测定大鼠血浆中 4 种探针药物的高效液相色谱方法,用 Cocktail 探针药物法,将雄性 SD 大鼠随机分为 2 组,给药组灌胃给予黄芩提取物混悬液,对照组灌胃给予相同剂量的生理盐水。给药 10 d 后尾静脉注射 4 种探针药物,眼眶取血,通过测定 4 种探针药物的代谢以评价 CYP1A2, CYP3A4, CYP2E1, CYP2C19 的活性,采用 Kinetica5.0 计算药代动力学参数。结果:4 种探针药物的 $T_{1/2}$ 较对照组均有增加,其中氨苯砜、氯唑沙宗和奥美拉唑的 $T_{1/2}$ 增加显著;氨苯砜、氯唑沙宗和奥美拉唑的 $MRT_{0\rightarrow\infty}$ 均有增加,其中氯唑沙宗和奥美拉唑的 $MRT_{0\rightarrow\infty}$ 增加显著。结论:黄芩提取物对 CYP1A2, CYP3A4, CYP2E1, CYP2C19 均有抑制作用,其中对 CYP3A4, CYP2E1, CYP2C19 抑制作用显著。

〔关键词〕 cocktail; 细胞色素 P450 酶; 咖啡因; 氨苯砜; 氯唑沙宗; 奥美拉唑; 黄芩

〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)02-0202-04

Effect of Scutellaria Extract to Cytochrome P450 Enzymes

YAO Jue-cheng^{1,2}, NI Jian^{1*}, HAN Jing¹, FENG Li-jun¹, YAN Lei¹

(1. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Beijing Durg Administration Haidian Branch, Beijing 100097, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To study the effect of Scutellaria extract to cytochrome P450 enzymes CYP1A2, CYP3A4, CYP2E1 and CYP2C19. **Method:** To establish an RP-HPLC method for the study of 4 probe drugs in rats plasma. The rats are divided in 2 groups randomly. One group were given Scutellaria extract once daily, another received normal saline once daily as the blank control. After 10 days of treatment, the rats were given 4 probe drugs by tail intravenous injection and the plasma were obtained at 0, 5, 10, 15, 30, 15, 60, 180, 360, 540, 720 min. The plasma concentration of 4 probe drugs was determined by RP-HPLC. The pharmacokinetic parameters were calculated by Kinetica 5.0. **Result:** The metabolism of dapsone, chlorzoxazone and omeprazole are slowed down significantly while the $T_{1/2}$ of all 4 probe drugs were increased. The $MRT_{0\rightarrow\infty}$ of chlorzoxazone and omeprazole were increased significantly. **Conclusion:** Scutellaria extract tended to be the inhibitor of CYP1A2,

〔收稿日期〕 20110815(003)

〔通讯作者〕 * 倪健, 博士, 教授, 从事中药新制剂的开发研究, E-mail: njtem@163.com

[9] 金始宇, 葛日光, 全秀莲, 等. 复方苦参注射液在老年肺癌性疼痛中的应用[J]. 中国误诊学杂志, 2004, 4(10):10.

[10] 张明东, 曲立贞. 复方苦参注射液治疗癌性疼痛 46 例观察[J]. 肿瘤的基础与临床杂志, 2008, 21(2):170.

[11] 王婉茹. 复方苦参注射液治疗癌性疼痛的临床观察[J]. 实用肿瘤学杂志, 2007, 21(5):439.

[12] 徐淑云. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:886, 882.

[13] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2 版. 北京, 人民卫生出版社, 1994:481, 714, 481, 714.

[14] 许相儒, 蒋纪凯. 苦参及其生物碱抗肿瘤活性研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(5):314.

[15] 熊玉兰, 王彦礼, 孙建辉, 等. 复方苦参注射液对荷瘤小鼠化疗增效减毒及免疫功能的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(11):48.

〔责任编辑 何伟〕

CYP3A4, CYP2E1 and CYP2C19. But CYP3A4 and CYP2E1 were affected significantly.

[**Key words**] cocktail; CYP450; caffeine; dapsone; chlorzoxazone; omeprazole; Scutellaria extract

黄芩提取物收载于《中国药典》2010 年版,黄芩苷含量不得低于 85.0%,现广泛应用于制药行业。为了评价黄芩提取物对 CYP450 酶系的影响,笔者参考文献[1-2],建立同时检测大鼠血浆中 4 种细胞色素 P450 酶探针药物,即咖啡因(CYP1A2)、氨苯砒(CYP3A4)、奥美拉唑(CYP2C19)和氯唑沙宗(CYP2E1)的反相高效液相色谱方法,通过计算药代动力学参数评价黄芩提取物对 CYP450 同工酶 CYP1A2, CYP3A4, CYP2E1, CYP2C19 活性的影响,从而判断黄芩提取物对这 4 种同工酶的诱导或抑制作用,为临床合理用药提供参考。

1 材料

1.1 仪器 岛津 LC-20AT 型高效液相色谱仪(四元泵, DAD 检测器, LC solution 岛津液相色谱工作站), Apollo C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5.0 μm), YP 10002 型电子天平(上海越平科学仪器有限公司), TDL-5 型离心机(上海安亭科学仪器厂), GL-88B 型涡旋混合仪(江苏海门其林贝尔科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂 咖啡因(coffine)为 Sigma-Aldrich 公司试剂、纯度 > 99%; 氨苯砒(dapsone)、氯唑沙宗(chlorzoxazone)、奥美拉唑(omeprazole)、安替比林(antipyrine)均来源于中国药品生物制品检定所,批号分别为 100114-199101, 100364-200301, 100760-200501, 100506-200301; 乙腈、甲醇均为 Fisher 公司色谱纯试剂,水为屈臣氏蒸馏水;黄芩提取物(自制,批号 20101223,符合《中国药典》2010 年版规定)。

1.3 动物 健康雄性 SD 大鼠,体重(300 ± 20) g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,生产许可证号 SCXK(京)2007-0001。

2 方法

2.1 色谱条件 Apollo C₁₈ 色谱柱,流动相 A-水, B-甲醇, C-乙腈,梯度洗脱(甲醇比例保持 35%; 0 ~ 4 min, 65% ~ 65% A; 4 ~ 9 min, 65% ~ 45% A; 9 ~ 12 min, 45% ~ 45% A; 12 ~ 14 min, 45% ~ 65% A; 14 ~ 20 min, 65% ~ 65% A),柱温 45 °C,检测波长 270 nm,流速 1.0 mL · min⁻¹,进样量 50 μL。内标为安替比林(4 mg · L⁻¹)。

2.2 分组及给药方法 将 SD 大鼠按体重随机,分为给药组和对照组,每组 6 只。给药组每天清晨灌

胃给予黄芩提取物,给药剂量 0.04 g · kg⁻¹,对照组给予相同剂量的生理盐水,给药 10 d。

2.3 血浆样品的处理与测定 大鼠在黄芩提取物给药的第 11 日清晨,尾静脉注射 4 种探针药物(尾静脉注射前 12 h,动物禁食不禁水)。咖啡因、氨苯砒、氯唑沙宗、奥美拉唑,均按 10 mg · kg⁻¹ 的剂量加 50% 乙醇溶液溶解,以 0.22 μm 微孔滤膜过滤后注射给药。分别于给药后的 0.03, 0.08, 0.17, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 3.0, 6.0, 9.0, 12.0 h 眼眶取血 0.5 mL,加入预先加入肝素钠的 EP 管中,以 1 万 r · min⁻¹ 离心 5 min,精密移取血浆 100 μL,加入预先吹干 200 μL 内标安替比林的离心管中,涡旋混合 1 min,加入乙腈 400 μL,涡旋混合 1 min,以 5 000 r · min⁻¹ 离心 20 min,精密移取上清液 400 μL,吹干,加甲醇-水(35:65)200 μL 溶解,取 50 μL 进样。

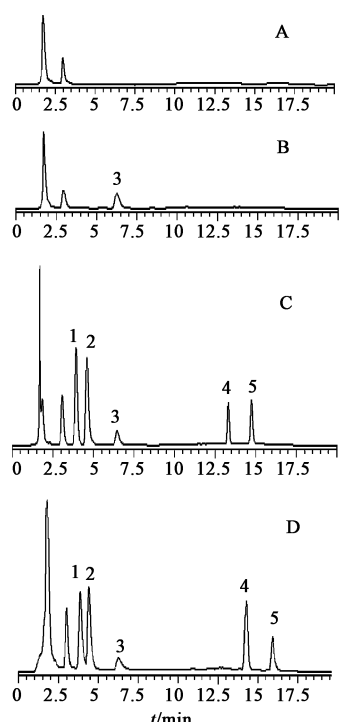
2.4 药代动力学参数计算及分析方法 药动学参数计算采用 Kinetica 5.0 软件完成,由于分析结果不符合房室模型,故采用非房室模型计算结果。

2.5 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,统计采用 SPSS 17.0 软件分析,经过正态分布及方差齐性检验后用 *t* 检验进行 2 组数据的比较。

3 结果

3.1 专属性 以空白血浆加入安替比林内标,血浆直接加入 4 种探针药物以及尾静脉注射 4 种探针药物后的血浆样品进行色谱行为比较。由图 1 可见 4 种探针药物与内标的分离良好,对测定无干扰。

3.2 标准曲线 取空白血浆 100 μL,加入 4 种探针药物,使血浆中咖啡因的质量浓度分别为 0.536, 1.609, 2.682, 5.364, 8.046, 10.728, 16.092, 21.456, 26.820, 32.184, 37.548 mg · L⁻¹; 氨苯砒的质量浓度分别为 0.235, 0.471, 1.412, 2.354, 4.708, 7.062, 9.416, 14.124, 18.832, 23.540, 28.248, 32.956, 37.664 mg · L⁻¹; 氯唑沙宗的质量浓度分别为 0.520, 1.560, 2.600, 5.200, 7.800, 10.400, 15.600, 20.800, 26.000, 31.200, 36.400, 41.600 mg · L⁻¹; 奥美拉唑的质量浓度分别为 0.449, 1.348, 2.246, 4.492, 6.738, 8.984, 13.476, 17.968, 22.460, 26.952, 31.444, 35.936 mg · L⁻¹,按 2.4 中血清样品处理方法处理,以探针药物和内标峰面积之比(*S*)对探针药物的质量浓度(*C*)(mg · L⁻¹)进行线性回归,得回归方程 $S_{\text{咖啡因}} = 0.163\ 2C - 0.204\ 5$



1. 氨苯砜; 2. 咖啡因; 3. 安替比林; 4. 氯唑沙宗; 5. 奥美拉唑
图 1 空白血浆(A)、加入内标的血浆(B)、
加入探针药物和内标的血浆(C)及
体内注射探针药物后的血浆(D)典型样品液相色谱

($r=0.994\ 9$), 线性范围 $10.728\sim42.912\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $S=0.169\ 8C-0.034\ 4$ ($r=0.998\ 1$), 线性范围 $0.536\sim10.728\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $S_{\text{氨苯砜}}=0.156\ 6C+0.590\ 4$ ($r=0.994\ 1$), 线性范围 $4.708\sim37.664\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $S=0.276\ 6C-0.023\ 7$ ($r=0.999\ 4$), 线性范围 $0.235\sim4.708\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $S_{\text{氯唑沙宗}}=0.051\ 1C+0.108\ 2$ ($r=0.998\ 7$), 线性范围 $10.400\sim41.600\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $S=0.062\ 6C+0.001\ 7$ ($r=0.994\ 6$), 线性范围 $(0.520\sim7.800)\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $S_{\text{奥美拉唑}}=0.063\ 4C+0.167\ 8$ ($r=0.994\ 7$), 线性范围 $8.984\sim35.936\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; $S=0.079\ 8C+0.009\ 5$ ($r=0.994\ 2$), 线性范围 $0.449\sim8.984\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 按药物色谱峰信噪比(S/N)=3 时的药物浓度作为检测限, 4 种探针药物最低检测限分别为 $0.322, 0.188, 0.416, 0.359\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.3 精密度和回收率 配制低、中、高 3 种质量浓度, 咖啡因、氨苯砜、氯唑沙宗、奥美拉唑在低浓度样品中的质量浓度分别为 $1.609, 1.412, 1.560, 1.348\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 在中浓度样品中分别为 $5.364, 4.708, 5.200, 4.492\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 在高浓度药品中分别为 $37.548, 37.664, 41.600, 35.936\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血浆样品 5 份, 按 2.4 中血浆样品处理方法处理, 计算日内精密度, 连续测定 5 日, 计算日间精密度。4 种探针药物的日

内、日间精密度的 $\text{RSD}<15\%$ 。4 种探针药物在低、中、高 3 种质量浓度的样品中方法回收率均介于 $90.39\%\sim114.27\%$ 。

3.4 稳定性

3.4.1 短期室温条件下的稳定性 配制低、中、高 3 种质量浓度, 4 种探针药物浓度同 3.3 项下, 按 2.4 中血浆样品处理方法处理, 分别在 0, 6, 12, 18, 24 h 测定, 计算样品在 24 h 内的稳定性, 结果低、中、高浓度样品在 24 h 内连续测定 5 次的精密度 RSD 均 $<15\%$ 。

3.4.2 冷冻-解冻稳定性 配制低、中、高 3 种质量浓度, 4 种探针药物浓度同 3.3 项下, 于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 贮存 24 h, 取出置室温放置使自然解冻, 融解完全后, 取样进行测定, 再将样品放回 $-20\ ^\circ\text{C}$ 贮存 24 h, 反复 3 次, 低、中、高浓度样品测定结果精密度 RSD 均 $<15\%$ 。

3.5 药动学研究

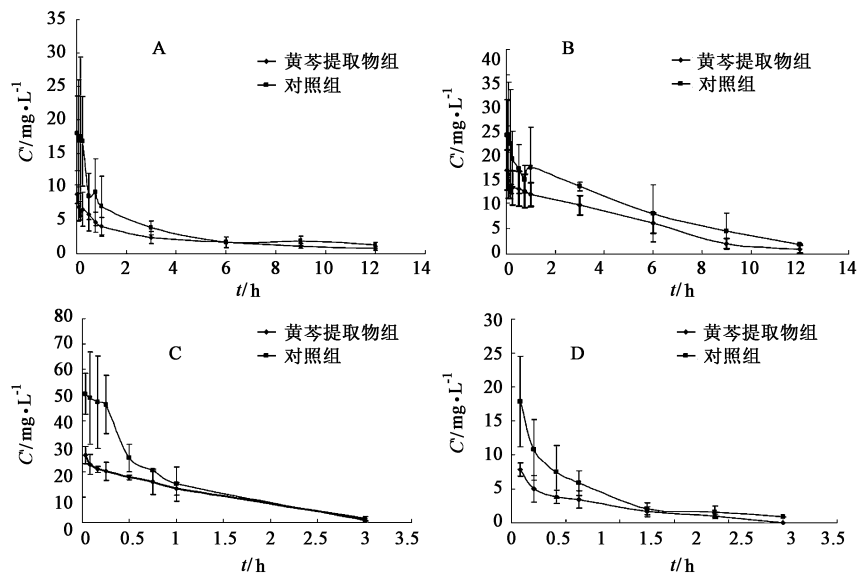
3.5.1 4 种探针药物的药-时曲线 见图 2。

3.5.2 4 种探针药物的药动学参数 通过对 4 种探针药物的药动学参数直观分析可见, 给药组 4 种探针药物的 $T_{1/2}$ 较对照组均有增加, 除咖啡因外的 3 种探针药物的 $\text{MRT}_{0\rightarrow\infty}$ 均有增加。采用 SPSS 17.0 进行成组 t 检验计算, 结果表明氨苯砜、氯唑沙宗、奥美拉唑的 $T_{1/2}$ 增加显著; 氯唑沙宗和奥美拉唑的 $\text{MRT}_{0\rightarrow\infty}$ 增加显著。经过综合分析结, 黄芩提取物对 CYP1A2, CYP3A4, CYP2E1, CYP2C19 均有抑制作用, 其中对 CYP3A4, CYP2E1, CYP2C19 抑制作用显著。见表 1。

4 讨论

本文建立的高效液相色谱法可以较好地用于血浆中 4 种探针药物的测定, 专属性强、精密度好。本实验采用 Cocktail 探针药物法评价了黄芩提取物对 CYP450 的影响。探针药物包括咖啡因、氨苯砜、氯唑沙宗、奥美拉唑。在非房室模型分析中, MRT 是一个非常重要的参数, 由于遵从“对数-正态分布”, 故静脉注射给药时 MRT 表示的时间是指药物被机体消除给药剂量的 63.2% 所需要时间。本文通过对半衰期 $T_{1/2}$ 与平均滞留时间 $\text{MRT}_{0\rightarrow\infty}$ 进行综合分析, 结果表明黄芩提取物对 CYP3A4, CYP2E1 和 CYP2C19 有显著的抑制作用。

CYP3A4 是肝脏含量最丰富的细胞色素酶亚型, 约占 40% , CYP3A4 在内源性物质(如类固醇)的代谢中起到重要作用, 同时也能够催化至少 50% 现用药物的氧化反应, 常见的如红霉素、硝苯地平。



A. 茴苯酮; B. 咖啡因; C. 氯唑沙宗; D. 奥美拉唑
图 2 SD 雄性大鼠胃灌黄芩提取物后 4 种探针药物的平均药-时曲线($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 1 大鼠血浆中 4 种探针药物的药动学参数($\bar{x} \pm s, n = 6$)

探针药物	分组	$T_{1/2}/h$	$AUC_{0 \rightarrow t}$	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	CL	V	$MRT_{0 \rightarrow \infty}$
			$/mg \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}$	$/mg \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}$			
茴苯酮	给药	$5.33 \pm 0.64^{1)}$	31.1 ± 9.7	220.5 ± 73.4	0.35 ± 0.11	2.45 ± 0.74	7.07 ± 0.64
	对照	4.36 ± 0.52	50.0 ± 10.6	279.2 ± 103.1	0.21 ± 0.05	1.17 ± 0.44	5.59 ± 1.71
咖啡因	给药	2.31 ± 0.66	74.0 ± 13.7	289.1 ± 69.1	0.14 ± 0.02	0.54 ± 0.08	3.88 ± 0.29
	对照	2.11 ± 0.51	121.9 ± 52.5	499.6 ± 283.4	0.10 ± 0.04	0.36 ± 0.13	3.90 ± 0.69
氯唑沙宗	给药	$0.72 \pm 0.20^{1)}$	32.0 ± 6.8	35.8 ± 13.0	0.33 ± 0.09	0.35 ± 0.09	$1.10 \pm 0.26^{2)}$
	对照	0.46 ± 0.12	40.5 ± 8.8	28.7 ± 8.8	0.26 ± 0.06	0.18 ± 0.04	0.70 ± 0.14
奥美拉唑	给药	$0.25 \pm 0.05^{1)}$	2.5 ± 0.6	0.9 ± 0.4	4.26 ± 1.15	1.44 ± 0.17	$0.35 \pm 0.08^{2)}$
	对照	0.17 ± 0.02	4.0 ± 1.1	1.0 ± 0.3	2.70 ± 0.9	0.64 ± 0.17	0.24 ± 0.02

注:与对照组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

CYP2E1 在毒物、致癌物及药物代谢的过程中占有重要地位。CYP2C19 催化代谢许多内源性底物、环境污染物以及临床上大约 2% 的药物。黄芩提取物可能会延缓 CYP3A4, CYP2E1, CYP2C19 3 种同工酶底物的代谢。

黄芩提取物在中药制药领域作为原料被广泛应用,与其他药物配伍使用。在临床用药中,可能与其他药物联合用药。当与其他通过 CYP3A4, CYP2E1, CYP2C19 酶代谢的药物合用时,需密切注意血药浓度的监测,根据药动学参数调整给药方案。

[参考文献]

[1] 扈金萍,闫淑莲,许燕霞,等. 反相高效液相色谱法同

时检测 3 种探针药物[J]. 色谱,2002,20(6):54.

[2] 贾海,许爱霞,袁继勇,等. 发酵虫草菌粉对细胞色素 P450 酶的影响研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(16):2079.

[3] 刘颖,焦建杰,娄建石. “Cocktail”探针药物法的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学,2006,11(11):1225.

[4] 郑姣,周宏灏. 黄酮类化合物对细胞色素 P450 CYP1, 2E1, 3A4 和 19 的影响[J]. 药学报,2007,42(1):8.

[5] 高晓新,梁爱华,郑素勤. 中草药对细胞色素 P450 酶系影响的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(9):64.

[责任编辑 邹晓翠]