

葛根芩连配方颗粒在大鼠体内的药物代谢产物研究

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, 南京 210046; 2. 合肥医工医药有限公司, 合肥 230088;

3. 南京中医药大学江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046;

4. 中国药科大学中药分析教研室, 南京 210009)

[摘要] **目的:** 研究葛根芩连配方颗粒在大鼠尿液中的代谢产物化学结构。**方法:** 采用 HPLC-DAD-MS 技术, 选用 Lichrospher C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈: 甲醇(6:4) (B), 检测波长 272 nm; ESI 离子源, 正、负离子模式。**结果:** 从灌胃葛根芩连配方颗粒的大鼠尿液中, 发现并鉴定了 11 个主要代谢产物的化学结构, 其中有 5 个来自葛根药材, 分别为葛根素、3'-甲氧基葛根素、7-木糖苷葛根素、葛根素-葡萄糖苷、大豆苷元-4'-O-硫酸酯; 有 4 个来自黄芩药材, 分别为野黄芩素-6-O-葡萄糖苷、汉黄芩素、千层纸素 A; 有 2 个来自甘草药材, 分别为异甘草素、甘草素。**结论:** 葛根芩连配方颗粒在大鼠尿液中代谢产物主要以苷元或以葡萄糖醛酸、硫酸的结合物排泄, 一些成分如葛根素主要以原形排泄。

[关键词] 葛根芩连配方颗粒; 代谢产物; HPLC

[中图分类号] R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0101-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20111017.0939.001 **[网络出版时间]** 2011-10-17 9:39

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20111017.0939.001.html>

Study on Metabolites of Gegen Qinlian Dispensing Granule in Rat

CHEN Li-hong^{1*}, FAN Hui-jia², TANG Yu-ping³, BIAN Yong¹,
YANG Nian-yun¹, JIN Shan-lin¹, WANG Qiang⁴

(1. Colledge of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Hefei Yigong Medicine Co., Ltd., Hefei 230088, China; 3. Jiangsu Key Laboratory for TCM

Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

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

[Abstract] **Objective:** To study the metabolism of Gegen Qinlian dispensing granule in rat. **Method:** The urine samples containing metabolites of Gegen Qinlian dispensing granule were analyzed by HPLC-DAD-MS. Chromatographic system was composed of lichrospher C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 0.1% formic acid (A)-acetonitrile: methanol(6:4) (B) as the mobile phase, detection at 272 nm; ESI source, positive and neglative mode. **Result:** Eleven components were identified as puerarin -glucoside, scutellarein-6-O-glucoside, puerarin, 3'-methoxypuerarin, 7-xylosidepuerarin, daidzein-4'-O-sulfate, Baicalein-6, 7-O-diglucuronide, isoliquiritigenin, liquiritigenin, wogonin, oroxylin A. **Conclusion:** Metabolites of Gegen Qinlian dispensing granule in rat were conjugated to glycuronic acid and sulphuric acid or excreted as aglycone, some components such as puerarin were mainly excreted unchanged in the urine.

[Key words] Gegen Qinlian dispensing granule; metabolite; HPLC

[收稿日期] 20110831(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30901995)

[通讯作者] * 陈丽红, 博士, 从事中药及复方效应物质基础及质量评价研究, Tel: 025-85811074, E-mail: clh_helen@163.com.

葛根芩连汤由葛根、黄芩、黄连和炙甘草组成,功能解表清热,主治外感表证未解,热邪入里,对泄泻,痢疾等有很好的疗效。葛根芩连汤组成简单、疗效确切,近年来成为学者研究的热点,其有效成分、配伍机制、药理作用和临床应用等相关报道较多^[1-2]。但对于葛根芩连配方颗粒的体内代谢研究尤其是尿液中代谢物研究较少。本研究将制备的葛根芩连配方颗粒给大鼠灌服,采用 HPLC-DAD-MS 技术分析、鉴定其在大鼠尿液中的代谢产物,为进一步研究葛根芩连汤的药应物质与配伍机制提供基础。

1 材料

1.1 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)(Agilent Technologies Inc. USA)。MS 使用 Agilent 1100 Series LC/MSD SL 型离子阱质谱仪(Agilent Technologies, Germany),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(Satorius Co. Ltd., 德国)。甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯。

1.2 药材 葛根(批号 100326)、黄芩(批号 100306)、黄连(批号 100320)及炙甘草(批号 100208)均购买于安徽丰原铜陵中药饮片有限公司。

1.3 试剂 对照品盐酸小檗碱(批号 110713-200911)、葛根素(批号 110752-200912)购于中国药品生物制品检定所;对照品黄芩苷购于四川维克奇生物科技有限公司,以上 3 个对照品含量均大于 98%。

1.4 动物 SD 大鼠,清洁级,体重(220 ± 20)g,雄性,由浙江省实验动物中心提供,合格批号。

1.5 葛根芩连配方颗粒制备 文献报道,在提取葛根芩连汤时,黄芩苷和小檗碱能形成沉淀,降低 2 者在提取液中的含量,同时甘草、葛根对小檗碱含量也有影响,因此在制备葛根芩连汤时黄连宜分煎^[3]。因此本实验中,葛根、黄芩、黄连、炙甘草按 8:3:3:2 比例的进行提取,提取方法采用葛根、黄芩、炙甘草 3 药合煎,黄连单煎。

1.5.1 3 药合煎 分别称取葛根 2.4 kg,黄芩 0.9 kg,炙甘草 0.6 kg,加水 10 倍,加热回流提取 1.5 h,过滤得滤液;滤渣加水 8 倍,继续加热回流提取 1.5 h,过滤得滤液,合并 2 次滤液。

1.5.2 黄连单煎 称取黄连 0.9 kg,分别加水 12,

10 倍,加热回流提取 2 次,每次 1.5 h,过滤得滤液,合并 2 次滤液。

1.5.3 配方颗粒制备 将 3 药合煎液和黄连提取液分别通过减压旋转蒸发器回收溶剂制成浓缩液,在水浴锅上蒸发水分制成浸膏,再用减压干燥箱减压干燥并打碎成粉末,将 2 种粉末均匀混合,制成葛根芩连汤复方粉末。

2 方法

2.1 药液的配置 称取葛根芩连配方颗粒一定量置研钵中,加入少许 0.5% 的羧甲基纤维钠(carboxymethylcellulose Na, CMC-Na)液,研磨后定量加 0.5% CMC-Na 液制成混悬液,ig 体积为 20 mL·kg⁻¹,给药剂量为葛根芩连配方颗粒 5 g·kg⁻¹。

2.2 尿样收集 SD 大鼠 10 只随机分为给药组和空白组。在饲养一段时间后,2 组同时收集给药前 24 h 尿液。此后,给药组:禁食、不禁水 12 h,ig 葛根芩连配方颗粒溶液;空白组:ig 等量生理盐水,同时收集给药后 2 组大鼠 24 h 尿液。

2.3 仪器条件

2.3.1 色谱条件 Lichrospher C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),预柱为 ZORBAX ODS C₁₈ 柱(4.6 mm × 12.5 mm, 5 μm);检测波长 272 nm;柱温 30 °C;流速 1.0 mL·min⁻¹;进样量 20 μL。流动相 0.1% 甲酸水(A)-乙腈:甲醇(6:4)(B),梯度洗脱。

2.3.2 质谱条件 离子化方式为电喷雾离子源(ESI);雾化气流速 1.5 L·min⁻¹,干燥气流速 8 L·min⁻¹,干燥器温度 350 °C,毛细管电压 3.5 kV。正、负离子模式,一级全扫描质量范围 *m/z* 50 ~ 800。

2.4 样品溶液制备 取上述收集的尿液样品 0.5 mL,加入 0.5 mL 甲醇,涡旋 3 min,12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液供 HPLC-DAD-MS 分析。

3 结果与讨论

3.1 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,本研究考察了不同浓度甲酸水和不同有机相的色谱效果。甲酸水浓度有 0.08%,0.1%,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。

3.2 葛根素的裂解规律 葛根素因为是碳苷键相对稳定,其准分子离子峰 *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]⁻, m/z 266.9 [M-H-120-28]⁻, 遵循 [M-H-120]⁻, [M-H-120-28]⁻ 裂解方式^[4]。

3.3 化合物的结构解析 化合物1 MS为 m/z 576.6 [M-H]⁻; 其 MS² 为 m/z 456.5 [M-H-120]⁻, 其相对分子质量与葛根素相差162, 推测可能是葛根素类成分; 因为大豆苷的7-*O*-糖苷键容易断裂, 而碎片中未检测到相应的碎片离子, 因此最后确认此化合物可能为葛根素-葡萄糖苷^[4-5]。

化合物3 MS为 m/z 446.8 [M-H]⁻; 其 MS² 为 m/z 284.8 [M-H-162]⁻, m/z 242.9, 根据参考文献, 推测可能是野黄芩素-6-*O*-葡萄糖苷^[6]。

化合物7 MS为 m/z 415.0 [M-H]⁻; 其 MS² 为 m/z 294.9 [M-H-120]⁻, m/z 266.9 [M-H-120-28]⁻, 与对照品葛根素的MS数据相同, 因此确定该化合物为葛根素。

化合物8 MS为 m/z 445.1 [M-H]⁻; 其 MS² 为 m/z 324.9 [M-H-120]⁻, m/z 296.9 [M-H-120-28]⁻, 该化合物与葛根素都遵循同一裂解方式 [M-H-120]⁻, [M-H-120-28]⁻, 根据参考文献, 确定该化合物为3'-甲氧基葛根素^[4]。

化合物9 MS为 m/z 547.2 [M-H]⁻; 其 MS² 为 m/z 294.9 [M-H-120-132]⁻, m/z 266.9 [M-H-120-132-28]⁻, 该化合物与葛根素裂解规律相同, 根据参考文献, 确定该化合物为7-木糖苷葛根素^[4]。

化合物11 MS为 m/z 621.1 [M-H]⁻; 其 MS² 为 m/z 445.0 [M-H-174]⁻, m/z 268.8 [M-H-174-174]⁻, 表明化合物结构中有2个葡萄糖醛酸基, 研究发现7位常与糖基相连, 而5位不容易与糖基相连, 因此推测该化合物可能为黄芩素-6,7-*O*-二葡萄糖醛酸苷^[7]。其余化合物的结构推测如表1所示。

表1 葛根芩连配方颗粒在大鼠尿液中的代谢产物 HPLC-MS 分析

No.	T_R /min	正离子		负离子		λ_{max} /nm	结构推测
		[M+H] ⁺	碎片离子	[M-H] ⁻	碎片离子		
1	1.5		ND ^a	576.6	456.5	207,219	葛根素-葡萄糖苷
2	1.5		ND	432.0	320.9	220,249	未知物
3	1.7		ND	446.8	284.8, 242.9	269	野黄芩素-6- <i>O</i> -葡萄糖苷
4	2.2		ND	222.8	142.9	205,270	未知物
5	2.3		ND	468.9	222.8	201,275	未知物
6	9.1		ND	433.0	204.9	219,249,290	未知物
7	21.7		ND	415.0	294.9,266.9	249,305	葛根素
8	23.9		ND	445.1	324.9,296.9	249	3'-甲氧基葛根素
9	26.2		ND	547.2	294.9,266.9	249	7-木糖苷葛根素
10	43.2		ND	332.9	252.9	238,321	大豆苷元-4'- <i>O</i> -硫酸酯 ^[8]
11	45.1		ND	621.1	445.0,268.8	286,310	黄芩素-6,7- <i>O</i> -二葡萄糖醛酸苷
12	49.8		ND	254.9	148.9,120.0	240,290,370	异甘草素
13	50.4		ND	254.9	134.9	236,272,365	甘草素
14	50.9	667.0	413.2	ND	ND	250,320	未知物
15	52.1		ND	282.9	267.9	276,316	汉黄芩素 ^[5]
16	63.1		ND	266.9	251.8	273	未知物
17	67.3		ND	282.9	267.8	272,320	千层纸素 A ^[5]
18	74.6	391.1	149.1	ND ¹⁾	ND ¹⁾	240,321	未知物

注:¹⁾ND: 未检测。

4 结论

本研究运用了 HPLC-DAD-MS 技术分析鉴定了葛根芩连汤在大鼠尿液中11个代谢物的基本结构。代谢物中有5个来自葛根药材, 分别为葛根素、3'-甲氧基葛根素、7-木糖苷葛根素、葛根素-葡萄糖苷、大豆苷元-4'-*O*-硫酸酯; 其中葛根素、3'-甲氧基葛根素、7-木糖苷葛根素、葛根素-葡萄糖苷大多以原形排泄, 葛根素部分以大豆苷元-4'-*O*-硫酸酯的形式排

泄^[8]。有4个来自黄芩药材, 分别为野黄芩素-6-*O*-葡萄糖苷、汉黄芩素、千层纸素 A。还有2个来自甘草药材, 分别为异甘草素、甘草素。

葛根芩连配方颗粒在大鼠尿液中来源于葛根药材的成分葛根素主要以原形排泄, 来源于黄芩的成分以苷元与葡萄糖苷形式排泄, 来源于甘草的成分主要以苷元形式排泄。据报道, 在大鼠尿中黄芩苷除原型外, 其代谢产物主要是汉黄芩苷和白杨素

中药艾迪注射液对异环磷酰胺在兔体内代谢的影响

张炜炜^{1,3}, 梁宁生^{2*}, 周长虹¹, 王昕昕¹

(1. 广西医科大学, 南宁 530021; 2. 广西医科大学附属肿瘤医院临床药学科, 南宁 530021; 3. 烟台毓璜顶医院肿瘤内科, 山东烟台 264000)

【摘要】 目的: 研究异环磷酰胺 (ifosfamide, IFO) 与艾迪注射液联用, 是否对其代谢有影响, 为临床合理用药的安全性和有效性提供参考依据。方法: 对 6 只兔子采用随机自身交叉对照试验设计, 对照组予生理盐水 10 mL 和异环磷酰胺 0.11 g·kg⁻¹ 用生理盐水稀释至 10 mL, 实验组予艾迪注射液 1 mL·kg⁻¹ 和异环磷酰胺 0.11 g·kg⁻¹ 均用生理盐水稀释至 10 mL; 均通过耳缘静脉注射给药。采用 C₁₈ 固体萃取小柱处理血样, 然后用高效液相色谱法测定异环磷酰胺的浓度, 最后计算并比较 2 组药代动力学参数及生物利用度。结果: 对照组和实验组 AUC_{0-∞} 分别为 (140.53 ± 39.26), (120.02 ± 25.89) mg·L⁻¹·h⁻¹, AUC₀₋₄ 分别为 (128.37 ± 34.26), (119.18 ± 25.51) mg·L⁻¹·h⁻¹, C_{max} 分别为 (158.63 ± 16.35), (132.61 ± 21.07) mg·L⁻¹; 实验组的相对生物利用度 F_{0-∞} 为 (91.13 ± 34.50)%, F₀₋₄ 为 (97.62 ± 32.59)%; 实验组生物利用度小于对照组, 两组非生物等效。结论: 两组异环磷酰胺在兔体内的代谢均符合二室房室模型。实验组 IFO 的生物利用度显著性小于对照组, 提示艾迪对 IFO 在兔体内药代动力学有显著性影响; 艾迪注射液还使 IFO 在兔体内的血药浓度明显降低, 推测艾迪注射液可能使其疗效也有所降低。

【关键词】 异环磷酰胺; 艾迪注射液; 高效液相; 药代动力学; 生物利用度

【中图分类号】 R945 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2011)24-0104-05

【收稿日期】 20110816(016)

【第一作者】 张炜炜, 主治医师, 硕士研究生, 从事抗肿瘤药物研究, Tel: 0535-6691999-81907, E-mail: wiiwizh@sina.com

【通讯作者】 * 梁宁生, 教授, 博士生导师, 从事抗肿瘤药物研究, Tel: 0771-5310605, E-mail: liang01@163.com

苷^[9]。本研究在大鼠尿液中发现黄芩的代谢产物主要是野黄芩素-6-O-葡萄糖苷、汉黄芩素与千层纸素 A, 未检测到报道的相关成分。试验结果表明药材配伍会影响一些成分的体内代谢。

本研究有助于进一步明确葛根芩连汤药效物质基础。检测到的化合物尚有几个结构未能确定, 需要进一步的研究确认, 另外来自黄连药材的各类生物碱成分可能因为吸收等因素浓度太低, 在本试验中未检测到相应信号, 有待进行下一步的深入研究。

【参考文献】

[1] 曹佩雪, 梁光义, 李霞, 等. 葛根芩连汤不同配伍情况下葛根素、黄芩苷、小檗碱的含量比较[J]. 中国药学报, 2003, 18(8): 459.
[2] 谭晓梅, 吴艳萍. 葛根芩连汤配伍葛根素在兔体内药代动力学研究[J]. 中药药理与临床, 2006, 22(5): 1.
[3] 陈丽红, 唐于平, 王强. 葛根芩连汤配方颗粒提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 14(16): 4.

[4] 李晓明, 杨滨, 黄璐琦. 高效液相色谱-质谱联用分析鉴别葛根的异黄酮成分[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(11): 1337.
[5] 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.
[6] 夏宏军, 朱珊, 梁键谋, 等. 大鼠灌胃灯盏花素后血浆、胆汁、尿液以及粪便中代谢产物的鉴定[J]. 中草药, 2009, 40(9): 1362.
[7] Day A J, Bao Y, Morgan M R. Conjugation positions of quercetin glucuronides and effect on biological activity[J]. Free Radic Biol Med, 2000, 29: 1234.
[8] Yasuda Takaaki, Kano Yoshihiro, Saito Ken-ichi, et al. Urinary and biliary metabolites of puerarin in rats[J]. Biol Pharm Bull, 1995, 18(2): 300.
[9] 李建荣, 左凤, 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.

【责任编辑】 聂淑琴