

黄芩水提物的代谢特征谱研究

赵保胜¹,董玲¹,刘洋^{1*},石任兵¹,徐瞰海¹,翟华强¹,方敏¹,汪国鹏¹,傅筱梅²
(1. 北京中医药大学,北京 100029; 2. 大道隆达医药科技发展有限公司,北京 100024)

[摘要] 目的:研究黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 根中紫外可检出成分的代谢过程。方法:①运用 HPLC-DAD 技术建立黄芩水提物化学成分特征谱,进行其总体化学成分的并行即时监测;②肝门静脉采血,建立黄芩水提物入血成分特征谱;③腹主动脉采血,建立黄芩水提物血中成分特征谱;④离体外翻肠囊法研究黄芩水提取物在大鼠无菌肠道的吸收,建立黄芩水提取物肠吸收成分特征谱;⑤在相同色谱条件下,分析比较大鼠肝门静脉入血成分、腹主动脉血中成分及肠吸收成分的化学成分特征谱,推断黄芩水提取物中化学成分的代谢过程。结果:分析的 17 种成分中,4 种成分被肠道菌群代谢转化,未能吸收入血,4 种成分不能被肠直接吸收,7 种成分可被肠道直接吸收入血;血中出现的 1 种成分在黄芩水提取物中未能查见,推测其为肠代谢转化后新生的成分吸收入血。结论:采用大鼠肝门静脉入血成分、腹主动脉血中成分及肠吸收成分(离体翻转肠囊法)的 HPLC-DAD 化学成分特征谱分析比较法可以判定中药整体用药时所含化学成分的代谢过程。

[关键词] 黄芩;中药代谢;肝门静脉入血成分;腹主动脉血中成分;肠吸收成分

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0144-05

Studies on Metabolism of Radix from *Scutellaria baicalensis*

ZHAO Bao-sheng¹, DONG Ling¹, LIU Yang^{1*}, SHI Ren-bing¹, XU Tun-hai¹,
ZHAI Hua-qiang¹, FANG Min¹, WANG Guo-peng¹, FU Xiao-mei²
(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
2. Dadaolongda Pharmaceutical Technology Co., Ltd, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the metabolism of components in the Radix of *Scutellaria baicalensis*. **Method:** ① We established the HPLC fingerprint of water extract of *S. baicalensis* and real-time monitored the chemical composition. ② We established the HPLC fingerprint of water extract of *S. baicalensis in vivo* and analyzed the rats' serum samples from hepatic portal vein with the established method. ③ We established the HPLC fingerprint of water extract of *S. baicalensis in vivo* and analyzed the rats' serum samples from aorta abdominalis with the established method. ④ Intestinal absorption of *S. baicalensis* was investigated by everting gut sacs in rats' sterile intestinal. ⑤ Using the established method, HPLC fingerprint spectrum of serum samples, the sample of herb, the sample after intestinal metabolism, rats' serum samples from hepatic portal vein and rats' serum samples from aorta abdominalis were investigated and analysed, in order to infer the metabolism of components in the Radix of *S. baicalensis*. **Result:** There were 17 compositions were detected, four of which were metabolized by intestinal flora and could not be absorbed into blood; four of them could not be absorbed directly into intestinal; seven compositions could be absorbed directly into intestinal; a new compound absorbed into blood while it was not detected in water extract of *S. baicalensis*. **Conclusion:** We could infer the metabolic processes of chemicals by analyzing and comparing HPLC fingerprint spectrum of serum samples, the sample of herb, the sample after intestinal metabolism,

[收稿日期] 2011-08-02

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(30801510)

[通讯作者] *刘洋,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:中药代谢与新药创制, Tel:010-84738629, E-mail:netug@126.com

rats' serum samples from hepatic portal vein and rats' serum samples from aorta abdominalis.

[**Key words**] *Scutellaria baicalensis*; metabolism of Chinese materia medica; serum compounds from hepatic portal vein; serum compounds from aorta abdominalis; intestinal absorbed compositions

黄芩为唇形科植物 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎的功效^[1]。黄芩含有多种化学成分,其中以黄酮类为代表的具有紫外吸收的化学成分与其功效作用密切相关^[2-3]。这些成分除少数可外用或局部应用外^[4-5],大多以适当形式吸收进入血液循环系统后,运送到相应的作用部位才能产生疗效。为明确黄芩药效动态物质基础过程,本实验把黄芩中紫外可检出成分作为整体,运用化学成分特征谱技术,通过大鼠入血成分(肝门静脉采血法)、血中成分(腹主动脉采血法)及肠吸收成分(离体翻转肠囊法)的化学成分比较,开展并行多成分的中药代谢动态研究,是努力接近中药传统用药方式,揭示中药疗效机制的科研方案。

1 材料

1.1 仪器 Waters 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),包括 1525 泵,2996 全波长紫外检测器和 Empower 数据采集系统, LG16-W 高速离心机(北京立离心机有限公司), QL-901 涡旋混合器(其林贝尔仪器制造公司), BT100-1F 蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司)。

1.2 药材和试剂 黄芩饮片(北京同仁堂药店), 甲醇、乙腈(色谱纯, Fisher 公司), 纯净水(娃哈哈), 其余试剂均为市售分析纯。

1.3 动物 清洁级健康 SD 大鼠, (240 ~ 260) g, 雌雄各半, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 合格证号 SCXK(京)2006-2009。饲养于符合国家标准屏障环境中, 室温 22 ℃ ~ 24 ℃, 相对湿度 60%, 常规饲养喂养, 自由饮水。

2 方法与条件

2.1 供试品的制备

2.1.1 黄芩灌胃液的制备 称取黄芩药材 150 g, 加 6 倍量蒸馏水加热回流 2 次, 每次 1 h, 合并 2 次滤液, 水浴浓缩至 80 mL, 制成含生药 1.875 g·mL⁻¹ 的混悬液, 供灌胃用。

2.1.2 黄芩供试液的制备 取适量按 2.1.1 制备的黄芩提取物, 水浴蒸干, 用 70% 甲醇配置成含药

量 0.1 g·mL⁻¹, 溶液过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液供 HPLC 分析。

2.1.3 人工肠液的制备 称取葡萄糖 0.7 g、氯化镁 0.01 g、磷酸二氢钠 0.16 g、氯化钠 3.9 g、氯化钾 0.175 g、氯化钙 0.185 g、碳酸氢钠 0.685 g, 用蒸馏水定容于 500 mL 量瓶中, 备用。

2.1.4 肠吸收样品的制备 采用禁食不禁水 18 h 健康 SD 大鼠, 水合氯醛麻醉, 小心将肠管同肠系膜剥离, 分别取空肠、回肠及结肠各 10 cm, 放入 37 ℃ 的人工肠液中, 冲洗至无内容物流出。小心剥离肠段表面的肠系膜和脂肪, 将肠管一端结扎于自制塑料套管, 小心将肠管翻转, 向肠囊内注入 2 mL 空白人工肠液, 结扎另一端, 放入 37 ℃ 恒温的黄芩水煎液中, 通入氧气。孵育 1 h 后将肠囊取出, 擦净表面液体, 倾出液体。过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液供 HPLC 分析。

2.1.5 腹主动脉血样品的采集和处理 采用禁食不禁水 18 h 的大鼠, 随机分为给药组和空白组。给药组以药液量 10 mL·kg⁻¹ ig, 空白组给予同体积的蒸馏水, 给药后 1 h, ip 10% 水合氯醛 1 mL, 大鼠麻醉后, 从腹主动脉取血约 6 mL, 置于 10 mL 离心管中, 9 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。吸取 0.5 mL 上清液于 5 mL 离心管中, 加甲醇 1.5 mL, 涡旋 2 min, 9 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 吸取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液供 HPLC 分析。空白血样同以上方法处理。

2.1.6 肝门静脉血样品的采集和处理 采用禁食不禁水 18 h 的大鼠, 随机分为给药组和空白组。给药组以药液量 10 mL·kg⁻¹ ig, 空白组给予同体积的蒸馏水, 给药后 1 h, ip 10% 水合氯醛 1 mL, 麻醉后, 从肝门静脉取血 4 mL, 置于 5 mL 离心管中, 处理同腹主动脉血。空白血样如上法处理。

2.2 液相色谱条件 Thermo scientific ODS-2 Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 带保护柱, 柱温 30 ℃, 流动相 A 为乙腈, B 为 0.1% 磷酸水, 梯度洗脱, 检测波长 276 nm, 进样量 20 μL, 流速 1.0 mL·min⁻¹。洗脱梯度变化如表 1。

表 1 液相色谱洗脱梯度

时间/min	乙腈/%	0.1% 磷酸水/%
0	10	90
5	10	90
6	12	88
12	12	88
15	19	81
25	19	81
30	22	78
35	24	76
50	24	76
83	85	15
88	85	15

按上述色谱条件分别进行 HPLC 分析, 获得黄芩供试液、肠吸收样品、给药肝门静脉血、给药大鼠腹主动脉血及相应空白血的成分谱。

3 结果

3.1 化学成分特征谱的建立

3.1.1 采血时间点的选择 分别对给药后 15, 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8 h 的 8 个时间点的腹主动脉血进行分析, 结果发现给药后 1 h 血样中色谱峰数量较多, 表明其所代表的化学成分数量较多, 故选择灌胃黄芩 1 h 后采血(图 1)。

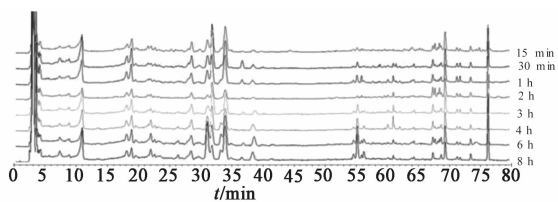


图 1 给药后不同采血时间点血中成分谱

3.1.2 测定波长的选择 根据黄芩中化学成分紫外吸收的主要特点, 对 250 nm(图 2), 276 nm(图 3), 330 nm(图 4) 下的特征图谱进行比较。发现 276 nm 下图谱中色谱峰数量较多, 表明该波长下检测到的化学成分数量较多, 且空白血的成分峰在此波长下响应较低, 同时黄芩供试液在此波长下的检测也良好, 综合衡量后选用 276 nm 作为检测波长。

3.1.3 黄芩水提物化学成分及其入血化学成分特征谱的建立 通过空白肝门静脉血成分谱、给药肝门静脉血成分谱及黄芩供试品成分谱比较可知, 成分 1, 2, 3, 4, 5, 6, 15, 16 原型吸收入血。成分 7 为药材中不含成分。成分 1 为黄芩苷, 通过与其对照品

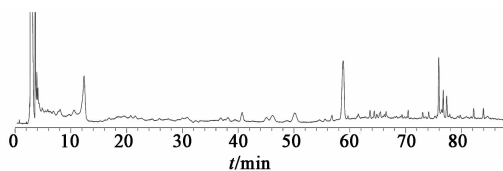


图 2 250 nm 检测波长下血中成分谱

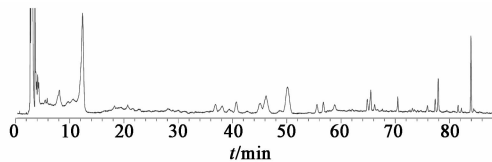


图 3 276 nm 检测波长下血中成分谱

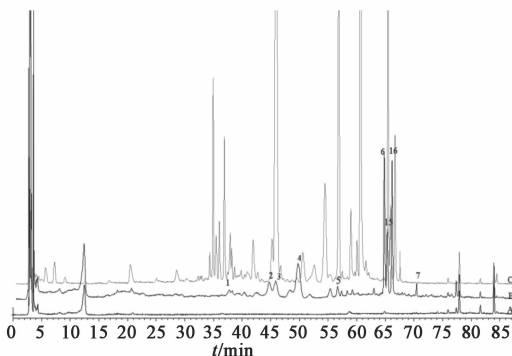


图 4 330 nm 检测波长下血中成分谱

的比照得以确认; 成分 2, 3 在 210 nm, 276 nm, 310 nm 左右有较大紫外吸收, 为典型的黄酮紫外吸收; 成分 4, 5, 6, 7 在 270 nm 有较大紫外吸收, 为二氢黄酮的典型特征(图 5)。

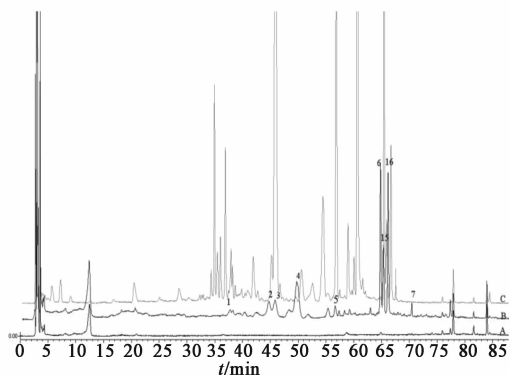


图 5 空白肝门静脉血成分(A)、给药肝门静脉血成分(B)、黄芩供试品成分(C)谱

3.2 肠代谢研究

3.2.1 离体翻转肠囊法研究的肠吸收成分 通过离体翻转肠囊法肠吸收成分谱与黄芩供试品成分谱比较, 有 12 个成分(1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 15, 16, 17) 被吸收。成分 2, 12, 13, 14 未被吸收。通过黄芩供试液的峰面积与肠吸收中成分的峰面积比(表 2)

可以看出,成分4,6,10,15,16的黄芩供试品成分与肠吸收成分的峰面积比值较大,显示这5个成分的肠吸收能力相对较弱(图6)。

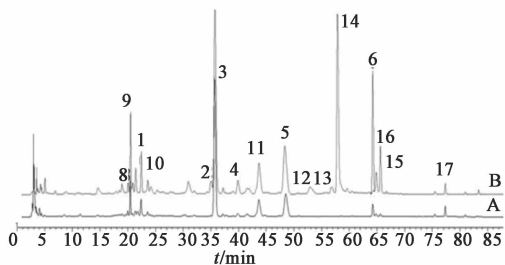


图6 肠吸收成分(A)、黄芩供试品成分(B)谱

表2 黄芩供试品成分与肠吸收成分的峰面积及其比值

峰号	黄芩供试品成分峰面积/HQ	肠吸收成分峰面积/CXS	HQ/CXS
1	826 951	350 060	2.36
3	7 540 388	4 870 175	1.54
4	546 520	107 825	5.07
5	3 330 339	1 355 794	2.46
6	2 890 769	290 025	9.97
8	143 430	62 310	2.30
9	1 181 787	505 825	2.33
10	518 688	86 534	5.99
11	827 069	85 3571	0.97
15	513 120	43 529	11.79
16	1 003 858	51 859	19.36
17	184 410	159 064	1.16

3.2.2 肝门静脉采血研究的入血成分 通过肝门静脉血成分谱与肠吸收成分谱比较,可以得知经过肠道菌群代谢后肠吸收入血和直接肠吸收入血的成分差异,成分8,9,10虽可被肠直接吸收,但是在肝门静脉血中未查见。通过肝门静脉入血成分的峰面积与肠吸收成分的峰面积比值(表3)可以看出,成分1,3,5的肝门静脉血成分与肠吸收成分的峰面积比值较小,显示只有少量直接吸收入血;成分2和7不能直接肠吸收入血,却在肝门静脉血中查见;成分4,6,15,16的肝门静脉血成分与肠吸收成分的峰面积比值较大,显示能大量直接吸收入血(图7)。

3.3 肝代谢研究 通过肝门静脉入血成分谱与腹主动脉血中成分谱比较,显示他们的成分基本一致。通过肝门静脉入血成分与腹主动脉血中成分的峰面积及其比值(表4)可以看出,通过肝脏后,成分6,16相对峰面积显著减少,说明这2个成分绝大部分被

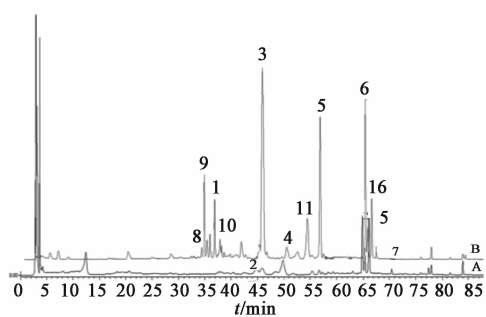


图7 肝门静脉血成分(A)、肠吸收成分(B)谱

表3 肝门静脉血成分与肠吸收成分的峰面积及其比值

峰号	肝门静脉血成分峰面积/MJM	肠吸收成分峰面积/CXS	MJM/CXS
1	48 943	350 060	0.14
3	277 798	4 870 175	0.05
4	949 983	107 825	8.81
5	128 519	1 355 794	0.09
6	1 138 187	290 025	3.92
15	528 837	43 529	12.15
16	1 126 918	51 859	21.73

肝脏代谢转化;成分1相对峰面积增加,说明成分1在肝代谢时由其他成分生成(图8)。

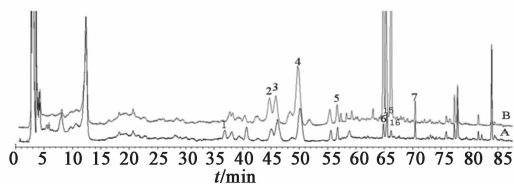


图8 腹主动脉血成分(A)、肝门静脉血成分(B)谱

表4 肝门静脉入血成分与肠吸收中成分的峰面积及其比值

峰号	肝门静脉入血成分峰面积/MJM	腹主动脉血中成分峰面积/FDM	MJM/FDM
1	48 943	92 488	0.53
2	228 148	115 775	1.97
3	277 798	240 597	1.15
4	949 983	553 665	1.71
5	128 519	86 391	1.49
6	1 138 187	66 691	17.06
7	66 938	66 900	1.00
15	528 837	129 858	4.07
16	1 126 918	29 715	37.92

4 讨论

采用大鼠肝门静脉入血成分、腹主动脉血中成分及肠吸收成分(离体翻转肠囊法)的 HPLC-DAD 化学成分特征谱分析比较法,对黄芩水提取物中口服大鼠后的 17 种化学成分的中药代谢情况进行了分析。成分 1(黄芩苷)可被肠道直接吸收入血,但门静脉血中相对含量较低,说明其可能部分被肠道菌群代谢。黄芩苷在肝代谢后血中总量增加,这与文献报道的黄芩苷昔元在肝脏内被结合上葡萄糖醛酸重新生成黄芩苷的结果一致^[6-9]。成分 2 不能被肠直接吸收,却在门静脉血中发现,推测其可能被肠道菌群转化吸收后,再在肠上皮细胞内转化为原型而吸收入血。成分 3 可被肠道直接吸收入血,但门静脉血中相对含量较低,说明其可能部分被肠道菌群代谢。成分 4 可被肠道直接吸收入血,但吸收能力较弱,但门静脉血中相对含量较高,推测其部分可能被肠道菌群转化吸收后,再在肠上皮细胞内转化为原型而吸收入血。成分 5 可被肠道直接吸收入血,但门静脉血中相对含量较低,说明其可能部分被肠道菌群代谢。成分 6 可被肠道直接吸收入血,但吸收能力较弱,但门静脉血中相对含量较高,推测其部分可能被肠道菌群转化吸收后,再在肠上皮细胞内转化为原型而吸收入血;而且此成分的肝代谢显著,肝代谢后腹主动脉血中总量显著下降。成分 7 为药材中不含成分,推测其为肠代谢转化后吸收入血的新生成分。成分 8,9,10,11 可被肠道直接吸收入血,但门静脉血中未查见,说明其可能在肠吸收前已经被肠道菌群代谢掉。成分 12,13,14 不能被肠直接吸收,门静脉血中也未查见。成分 15 可被肠道直接吸收入血,但吸收能力较弱,但门静脉血中相对含量较高,推测其部分可能被肠道菌群转化吸收后,再在肠上皮细胞内转化为原型而吸收入血;而且此成分的肝代谢显著,肝代谢后腹主动脉血中总量显著下降。成分 16 可被肠道直接吸收入血,但吸收能力较弱,但门静脉血中相对含量较高,推测其部分可能被肠道菌群转化吸收后,再在肠上皮细胞内转化为原型而吸收入血。成分 17 可被肠道直接吸收入血,但因空白血样中的固有紫外吸收成分干扰,对其在肝门静脉和腹主动脉血样中的分析受到影响,还

不能准确判断他的其他代谢特征。

中药代谢的研究重点之一在于中药成分疗效过程的结构变化,以区分药代动力学的动力特征和药效学的效应特征;其特点在于对中药成分疗效过程的动态追踪、全程分析和关联认知。本研究依据中药的传统用药方式,以黄芩水提取物总体成分给药的方式,研究其中所含多种成分在总体成分背景下的代谢过程,目前开展的研究是基于定性研究的早期工作,只进行了黄芩苷的指认,其他成分的指认和深入的定量研究正在进行中。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010: 282.
- [2] 王晓瑜, 龙汉安. 黄芩及黄酮类成分防治肿瘤作用的研究进展[J]. 华西医学, 2011, 26(2):297.
- [3] 汤立建, 赵良才, 李庆民, 等. 黄芩黄酮类成分抗肿瘤作用及机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(1):21.
- [4] 李敏, 杨瑞芳. 黄芩药理学研究进展[J]. 临床和实验医学杂志, 2009, 8(1):137.
- [5] 冯则怡. 黄芩外用治疗皮肤病[J]. 新中医, 2004, 36(5):67.
- [6] 庞丽琼, 梁琼麟, 刘清飞, 等. 大鼠体内复方清开灵代谢物的分析[J]. 分析化学, 2007, 35(10):1421.
- [7] Kim Y S, Kim J J, Cho K H, et al. Biotransformation of ginsenoside Rb₁, crocin, amygdalin, geniposide, puerarin, ginsenoside Re, hesperidin, poncirin, glycyrrhizin, and baicalin by human fecal microflora and its relation to cytotoxicity against tumor cells [J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(6):1109.
- [8] 刘李, 邓远雄, 张冬梅, 等. 小檗碱对黄芩苷在大鼠体内中药代动力学的影响[J]. 中国天然药物, 2007, 5(2):137.
- [9] Akao T, Kawabata K, Yanagisawa E, et al. Baicalin, the predominant flavone glucuronide of scutellariae radix, is absorbed from the rat gastrointestinal tract as the aglycone and restored to its original form [J]. Pharm Pharmacol, 2000, 52(12):1563.

[责任编辑 何伟]