

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 Kinetica 5.0 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℃,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。

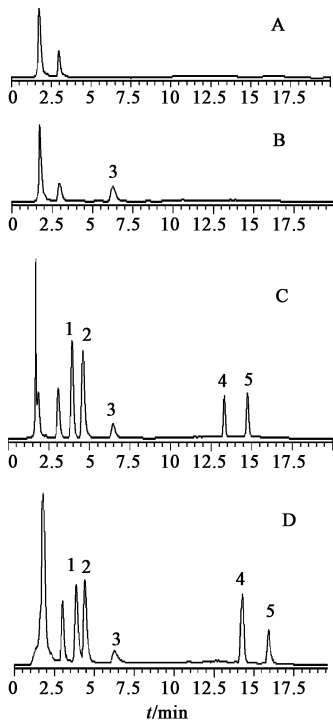
2.4 药代动力学参数计算及分析方法 药动力学参数计算采用Kinetica 5.0软件完成,由于分析结果不符合房室模型,故采用非房室模型计算结果。

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

($r = 0.9949$), 线性范围 $10.728 \sim 42.912 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $S = 0.1698C - 0.0344$ ($r = 0.9981$), 线性范围 $0.536 \sim 10.728 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $S_{\text{氨苯砜}} = 0.1566C + 0.5904$ ($r = 0.9941$), 线性范围 $4.708 \sim 37.664 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $S = 0.2766C - 0.0237$ ($r = 0.9994$), 线性范围 $0.235 \sim 4.708 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $S_{\text{氯唑沙宗}} = 0.0511C + 0.1082$ ($r = 0.9987$), 线性范围 $10.400 \sim 41.600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $S = 0.0626C + 0.0017$ ($r = 0.9946$), 线性范围 $(0.520 \sim 7.800) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $S_{\text{奥美拉唑}} = 0.0634C + 0.1678$ ($r = 0.9947$), 线性范围 $8.984 \sim 35.936 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $S = 0.0798C + 0.0095$ ($r = 0.9942$), 线性范围 $0.449 \sim 8.984 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 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 $RSD < 15\%$ 。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 $90.39\% \sim 114.27\%$ 。

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°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°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

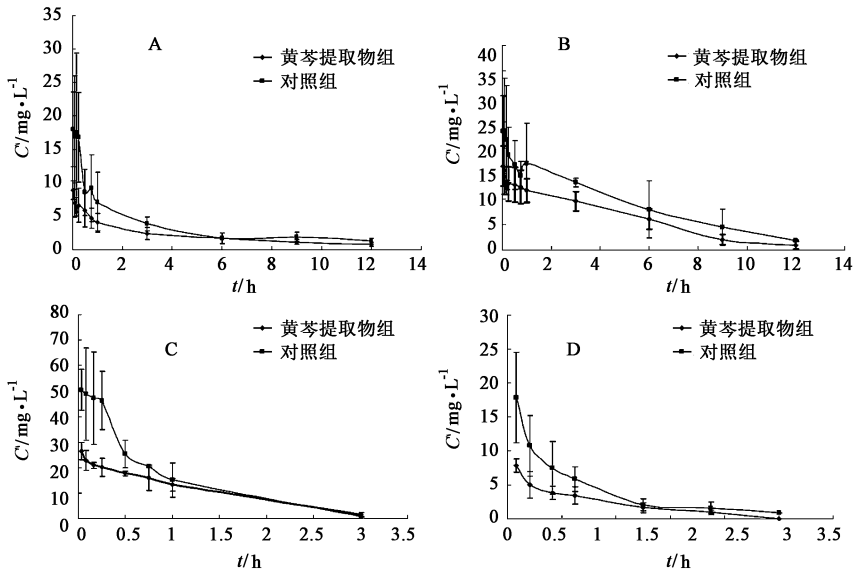
3.5.1 4 种探针药物的药-时曲线 见图 2。

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 $MRT_{0-\infty}$ 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 $MRT_{0-\infty}$ 增加显著。经过综合分析, 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 $MRT_{0-\infty}$ 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. 氨苯砜; B. 咖啡因; C. 氯唑沙宗; D. 奥美拉唑

图 2 SD 雄性大鼠灌胃黄芩提取物后 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	$MRT_{0 \rightarrow \infty}$
			$/mg \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}$	$/mg \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}$			
氨苯砜	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、环境污染物质以及临床上大约 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]