

· 药物代谢 ·

清咽利膈丸大鼠体内给药后黄芩苷的药动学研究

张霓^{1*}, 赵秀莉¹, 李发美²

(1. 郑州大学附属肿瘤医院/河南省肿瘤医院, 郑州 450008; 2. 沈阳药科大学, 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 采用高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS-MS)研究清咽利膈丸给予大鼠后黄芩苷的药物代谢动力学。方法: 以乙腈-0.2%甲酸水溶液(24:76)为流动相, 以木犀草素为内标, 在ZOBAX SB-C₁₈(2.1 mm × 50 mm, 3.5 μm)柱上进行分离, 流速为0.3 mL·min⁻¹。采用电喷雾离子源(ESI源)在正离子检测方式下进行多反应离子监测(MRM)。用于定量分析的离子反应分别为 m/z 447.1→270.9(黄芩苷)和 m/z 286.9→152.9(木犀草素, 内标)。结果: 大鼠灌胃给予清咽利膈丸后, 黄芩苷的达峰时间为2.4 h, 峰质量浓度为0.59 mg·L⁻¹, 浓度-时间曲线下面积为2.80 mg·L⁻¹·h⁻¹, 半衰期为8.24 h。黄芩苷的药-时曲线呈现双峰。提示黄芩苷在体内存在肝-肠循环。结论: 该方法专属性强, 灵敏度高, 药动学研究结果为清咽利膈丸的临床应用提供了参考。

[关键词] 清咽利膈丸; 黄芩苷; 药动学; 高效液相色谱-串联质谱法

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)05-0114-04

[doi] 10.11653/syfyj2014050114

Pharmacokinetics of Baicalin in Rats after Oral Administration of Qingyan Lige Pills by HPLC-MS-MS

ZHANG Ni^{1*}, ZHAO Xiu-li¹, LI Fa-mei²

(1. Cancer Hospital Affiliated to Zhengzhou University & Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450008, China;
2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the pharmacokinetics of baicalin in rats after oral administration of Qingyan Lige pills by HPLC-MS-MS. **Method:** With luteolin as the internal standard (IS), the analysis was carried out on a ZOBAX SB-C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 3.5 μm) column using acetonitrile-0.2% formic acid (24:76) as the mobile phase. The detection was performed by means of electrospray ionization (ESI) mass spectrometry in positive ion mode with multiple reaction monitoring (MRM). Quantification was performed using the transitions of m/z 447.1→270.9 for baicalin, m/z 286.9→152.9 for IS. **Result:** After oral administration of Qingyan Lige pills to SD rats, the T_{max} of baicalin was 2.4 h, the C_{max} was 0.59 mg·L⁻¹, the $AUC_{0-\infty}$ was 2.80 mg·L⁻¹·h and the $t_{1/2}$ was 8.24 h. The plasma concentration-time curve exhibited double peak, which indicated that baicalin may have hepatoenteral circulation *in vivo*. **Conclusion:** The method described in this report has high sensitivity and selectivity. The results of pharmacokinetic study on baicalin would be a suitable reference in clinical application for Qingyan Lige pills.

[Key words] Qingyan Lige pills; baicalin; pharmacokinetics; HPLC-MS-MS

清咽利膈丸是由射干、黄芩等13味中药组成的中药成方制剂,具有清热利咽,消肿止痛的功效,用于外感时毒,脏腑积热,咽喉肿痛,胸膈不利,口苦舌干。目前,有关黄芩苷药代动力学研究报道^[1-3]中,有单味黄芩、方剂中的黄芩苷的药代动力学研究,但

[收稿日期] 20130425(020)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81302796)

[通讯作者] *张霓, 硕士, 药师, 从事中药质量控制, Tel: 15037186591, E-mail: ninijeny@163.com

有关清咽利膈丸中黄芩苷在大鼠体内药代动力学的研究未见报道。本研究建立了大鼠血浆中黄芩苷高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS-MS)测定方法,以木犀草素为内标,并首次对清咽利膈丸给药后黄芩苷的药动学行为进行研究。

1 材料

1.1 药品与试剂 木犀草素对照品(111520-200201,中国药品生物制品检定所),清咽利膈丸10批(5082001-5082010,北京同仁堂科技发展股份有限公司),甲酸、乙腈为色谱纯,水为纯化水,其他试剂为分析纯。

1.2 仪器 Agilent1200 高效液相色谱仪,6410 型三重四极杆串联质谱仪(美国安捷伦公司),TGL-16G-A 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),XW-80A 型旋涡混合器(上海精科实业有限公司),BF-2000 型氮气吹干仪(上海勇规分析仪器有限公司),10~100 μL 微量取样器(德国 Eppendorf 公司),AL204 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),SB2200 型超声仪(上海必能超声仪器公司)。

1.3 动物 健康 SD 大鼠(250 ± 20) g,雄性,由军事医学科学院动物中心提供。合格证号 SCXK-豫-602023。

2 方法

2.1 色谱与质谱条件 液相色谱条件:ZOBAX SB-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 50 mm, 3.5 μm);流动相 0.2% 甲酸水溶液-乙腈(76:24),流速 0.3 mL \cdot min⁻¹,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$,进样量 20 μL 。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI 源),正离子检测,多反应离子监测(MRM)方式,定量分析时的离子反应分别为 m/z 447.1 \rightarrow 270.9(黄芩苷)和 m/z 286.9 \rightarrow 152.9(内标木犀草素)。雾化气压力 40 psig,干燥气流速 9.0 L \cdot min⁻¹,干燥气温度 350 $^{\circ}\text{C}$,毛细管电压 4 000 V,毛细管出口电压分别为黄芩苷 110 V,木犀草素 140 V;碰撞能量(CE)分别为黄芩苷 18 eV,木犀草素 36 eV。

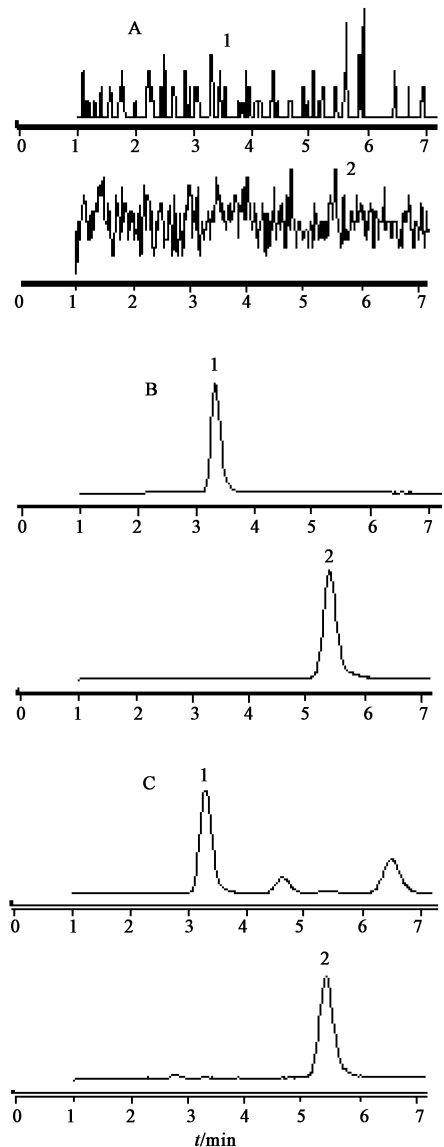
2.2 血浆样品的预处理 精密吸取内标 20 μL 于具塞离心管中,加入大鼠血浆样品 200 μL ,甲醇 1 mL,涡旋 1 min,16 000 r \cdot min⁻¹ 离心 30 min,取上清液于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气流吹干,残渣用 200 μL 流动相溶解,16 000 r \cdot min⁻¹ 离心 30 min,取上清液 20 μL 进样分析。

2.3 对照品储备液的制备 精密称取黄芩苷对照品适量,用甲醇溶解,配成质量浓度为 200 mg \cdot L⁻¹ 的储备液,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存。

2.4 药动学试验 取 SD 大鼠 5 只,给药前禁食不禁水 12 h,称重,按 1.25 g \cdot kg⁻¹ (含黄芩苷 6 mg \cdot kg⁻¹) 灌胃给予清咽利膈丸水溶液,于给药前(0 h)和给药后 0.25,0.5,1,1.5,2,3,5,7,9,12,16,24 h 由大鼠眼眶内眦静脉采血约 0.5 mL,置已肝素化试管中,6 000 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min,取 200 μL 大鼠血浆加入已装有 1 mol \cdot L⁻¹ 盐酸 10 μL 的离心管内,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻待测。

3 结果

3.1 专属性试验 黄芩苷对照品溶液+空白血浆、空白血浆样品及给药后 5 h 含药血浆的色谱图见图 1。由图可知,血浆中的内源性物质不干扰黄芩苷和内标物的测定。黄芩苷和内标物的保留时间分别为



A. 大鼠空白血浆;B. 黄芩苷对照品+空白血浆;C. 给药 5 h 后血浆
1. 黄芩苷;2. 内标

图 1 清咽利膈丸给药后大鼠体内黄芩苷和内标的 HPLC 色谱

3.3, 5.4 min。

3.2 标准曲线的制备 取空白血浆 200 μL , 加黄芩苷系列标准溶液 20 μL , 配制成相当于黄芩苷为 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血浆对照样品溶液, 除不加甲醇 20 μL 外, 按“2.2 血浆样品的预处理方法”项下依法操作, 建立标准曲线。以待测物质量浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标, 用加权最小二乘法进行回归运算, 求得的直线回归方程即为标准曲线。典型的回归方程为: $Y = 81.64X - 0.779, r = 0.999 2$; 黄芩苷在 10 ~ 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性良好。

3.3 方法的精密度和准确度 取空白血浆 200 μL , 按“标准曲线的制备”项下的方法分别制备低、中、高 3 个质量浓度 (黄芩苷 20, 100, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的质量控制 (QC) 样品, 每一质量浓度进行 5 样本分析, 连续测定 3 d, 并与标准曲线同时进行, 以当日的标准曲线计算 QC 样品的浓度, 与配制浓度对照, 求得方法的精密度 (RSD) 和准确度 (RE), 结果见表 1。实验数据表明, 黄芩苷的日内和日间 RSD 均不

表 1 黄芩苷血浆样品的精密度和准确度 ($\bar{x} \pm s$)

加入量 $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	测得量 $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	日内 RSD/%	日间 RSD/%	RE/%
20	19.6 \pm 1.42	6.8	9.3	-2.2
100	99.2 \pm 4.06	3.3	7.1	-0.77
500	503.4 \pm 19.3	3.5	5.2	0.68

表 3 黄芩苷血浆样品的稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

质量浓度 $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	准确度			
	室温稳定性	冰冻稳定性	冻融稳定性	样品处理后稳定性
20	101.4 \pm 2.1	96.3 \pm 4.8	102.3 \pm 6.2	93.4 \pm 4.5
100	93.6 \pm 5.2	91.2 \pm 8.8	99.7 \pm 7.9	92.3 \pm 6.1
500	92.5 \pm 4.7	94.6 \pm 6.7	96.6 \pm 7.7	94.1 \pm 2.3

3.6 基质效应考察 取空白血浆 200 μL , 除不加内标溶液外, 按“血浆样品的处理方法”项下的方法操作, 向获得的上清液中加入内标溶液和相应质量浓度 (黄芩苷 20, 100, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的系列对照溶液各 20 μL , 涡旋混合, 40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气流下吹干, 残渣用 200 μL 流动相溶解, 取 20 μL 进样分析, 所得的峰面积与对照溶液直接进样的峰面积相比。结果表明, 黄芩苷、内标的峰面积比值分别为 93.4% 和 90.2%, 不存在明显的基质效应。

3.7 药动学研究 大鼠灌胃给予清咽利膈丸药液后, 黄芩苷的平均血药浓度-时间曲线见图 2。由消

> 6.8%, 9.3%, RE 在 $\pm 2.2\%$ 之内。

3.4 提取回收率 取空白血浆 200 μL , 制备低、中、高 3 个质量浓度 (黄芩苷 20, 100, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 QC 样品, 每一浓度进行 5 个样本分析, 获得相应的峰面积。同时另取空白血浆 200 μL , 除不加内标外, 按“血浆样品的预处理方法”项下的方法操作, 向获得的上清液中加入内标溶液和相应浓度的系列标准溶液各 20 μL , 涡旋混合, 40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气流下吹干, 残渣用 200 μL 流动相溶解, 取 20 μL 进样分析, 获得相应的峰面积。以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算平均提取回收率, 每一浓度进行 5 样本分析, 结果见表 2。内标的平均提取回收率为 (78.6 \pm 4.4)%。

表 2 黄芩苷在大鼠血浆中的提取回收率 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率/%
20	82.5 \pm 5.5
100	84.3 \pm 4.1
500	85.3 \pm 3.5

3.5 样品稳定性考察 取空白血浆 200 μL , 制备低、中、高 3 个质量浓度 (黄芩苷 20, 100, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 QC 样品各 3 样本, 考察样品在室温放置 4 h、-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 30 d、经历 3 个冷冻-解冻循环和经提取后于室温放置 4 h 条件下的稳定性, 结果见表 3。结果表明, 黄芩苷在上述条件下可保持稳定。

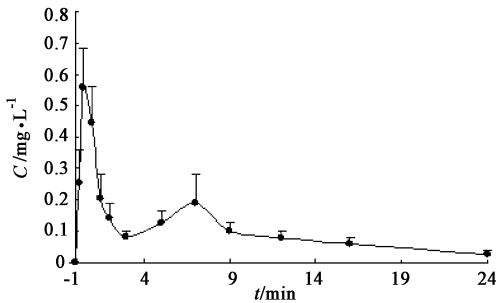
除相的末 4 个浓度点计算消除速率常数 (k_e), 并由公式 $0.693/k_e$ 计算末端消除半衰期 ($t_{1/2}$); 以梯形法计算 0 到 t 时刻的 AUC_{0-t} , 加上由 t 外推至无穷大的曲线下面积 (C_t/k_e), 计算得 $\text{AUC}_{0-\infty}$, 主要药物动力学参数见表 4。

4 讨论

4.1 质谱条件考察 本试验采用了电喷雾电离源 (ESI) 电离方式, 试验中首先对各化合物的 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 离子进行一级全扫描质谱分析, 根据母离子的响应强度对毛细管出口电压进行了优化, 再对 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 进行二级质谱分析, 通过优化碰撞能量 (CE),

表4 大鼠灌胃给予清咽利膈丸后黄芩苷的药代动力学参数

No.	C_{max} /mg·L ⁻¹	T_{max} /h	$t_{1/2}$ /h	k_e /h ⁻¹	AUC _{0-24h} /mg·L ⁻¹ ·h	AUC _{0-∞} /mg·L ⁻¹ ·h
1	0.74	2.0	7.5	0.092	2.28	2.50
2	0.54	2.0	8.2	0.085	2.19	2.44
3	0.53	3.0	8.3	0.083	2.36	2.65
4	0.60	2.0	7.5	0.092	2.72	2.99
5	0.54	3.0	8.6	0.072	2.76	3.42
Mean	0.59	2.4	8.24	0.085	2.46	2.80
SD	0.09	0.55	0.86	0.008	0.26	0.41

图2 大鼠灌胃给予清咽利膈丸后黄芩苷的平均血药浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s$)

使黄芩苷碎片离子、木犀草素碎片离子的响应最强且较稳定。

4.2 样品预处理方法的选择 文献[4]报道,黄芩苷在血浆、尿样和组织样品中均存在不同程度的降解并且表现为pH和温度依赖型。黄芩苷在血浆中的降解是由自由基介导的氧化还原反应引起的。加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 $10 \mu\text{L}$ 酸化血浆可使黄芩苷在血浆中保持相对稳定。文献[5-7]多采用沉淀蛋白的方法对黄芩苷的血浆样品进行处理。采用乙腈沉淀蛋白的方法进行血浆样品处理时,黄芩苷很不稳定。选用甲醇作为沉淀剂,黄芩苷比较稳定且内源性物质的干扰较小,效果较好。

4.3 药动力学研究结果 从血药浓度-时间曲线可以看出,黄芩苷吸收不规则,血药浓度-时间曲线出现“双峰”,与文献[8-10]中报道的相一致。根据有关报道^[11]分析,口服给药的多峰现象产生的主要机制

为肝肠循环。黄芩苷是含羟基的黄酮类化合物,黄酮类化合物的胆汁排泄是排泄的重要途径,经小肠再吸收发生肝肠循环,引起血药浓度回升。文中双峰现象的出现还可能与清咽利膈丸中其他有效成分影响了黄芩苷的药物动力学有关。该组方中的栀子、大黄、薄荷均含有多种较强的利胆成分,当这些物质发挥作用时,很可能会影响黄芩苷的排泄和小肠的再吸收。

[参考文献]

- [1] 赵绪元,姚金成,胡领,等. RP-HPLC法测定银黄冲剂中黄芩苷在大鼠体内的血药浓度及药代动力学研究[J]. 天然药物研究与开发,2007,19(4):645.
- [2] 杨萍,谢云. 清开灵注射液中黄芩苷的药代动力学研究[J]. 湖北中医药大学学报,2011,13(5):28.
- [3] 柳文媛,余成霞,冯锋. LC-MS/MS法同时测定大鼠血浆中黄芩素及黄芩苷浓度[J]. 中国药科大学学报,2007,38(2):129.
- [4] 邢杰. 黄芩苷在动物体内的吸收和代谢研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2005.
- [5] 赵玉男,石钺,邢东明,等. YL-2000中黄芩苷在正常大鼠体内的药物动力学研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2002,8(9):59.
- [6] 杨新检,王雷,王学艳. 黄芩苷滴丸的体内药理学研究[J]. 中国医院药学杂志,2006,26(4):445.
- [7] 石万贞,姚金成,梁玉格,等. 银黄颗粒剂中黄芩苷在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中医药导报,2005,11(11):10.
- [8] 张岩,肇丽梅,韩国柱. 清热合剂中黄芩苷在大鼠体内的药物动力学[J]. 华西药学杂志,2005,20(3):232.
- [9] 严东明,马越鸣,王天明,等. 小鼠体内泻心汤中黄芩苷药代动力学[J]. 中成药,2007,29(4):493.
- [10] 肇丽梅,何晓静,邱枫. 药理效应法测定黄芩苷及清热合剂的药理学参数[J]. 广东药学院学报,2006,22(1):22.
- [11] 沈群,罗佳波. 中药复方药代动力学研究的特殊性[J]. 中成药,2004,26(8):665.

[责任编辑 邹晓翠]