

代谢分析

牛黄解毒片及黄芩大鼠给药后血浆中黄芩
特征成分药代动力学的比较研究*刘玥昕^{1,2}, 宋敏², 杭太俊^{2**}, 吴骁^{3**}

(1. 天津药物研究院药业有限责任公司, 天津 300301; 2. 中国药科大学药物分析系, 南京 210009; 3. 南京中医药大学, 南京 210023)

摘要 目的: 建立高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS法)同时检测大鼠血浆中6个黄芩特征成分(黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素、汉黄芩苷、白杨素及千层纸素A)的含量, 比较大鼠牛黄解毒片及黄芩给药后黄芩特征成分在大鼠体内药代动力学行为的差异。方法: 2组大鼠分别灌胃给予牛黄解毒片混悬液250 mg·kg⁻¹或处方等量的黄芩饮片提取液, 收集不同时间点血浆样本, 以柚皮素为内标, 经甲醇沉淀蛋白后, 采用Inertsil C₈-3(150 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 以0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸甲醇溶液(B)为流动相, 线性梯度洗脱, 流速1.0 mL·min⁻¹, 柱温35℃, 采用电喷雾离子源(ESI), 正离子扫描, 多反应监测模式(MRM)检测黄芩特征成分, 并计算药代动力学参数。结果: 黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素、汉黄芩苷、白杨素及千层纸素A 6个黄芩特征成分均在5~500 ng·mL⁻¹范围内线性关系良好, 准确度为88.43%~108.6%, 批间精密度及批内精密度均<15%, 基质效应和血浆样品稳定性均可满足生物样品分析要求。大鼠灌胃黄芩饮片提取液及牛黄解毒片混悬液后, 血浆中检测出黄芩苷及汉黄芩苷2个主要成分; 与单味黄芩组比较, 牛黄解毒片组给药后大鼠血浆中汉黄芩苷的AUC_{0-t}、黄芩苷与汉黄芩苷的C_{max}均显著增加, T_{max}显著缩短。结论: 建立的方法能同时测定黄芩6个特征成分, 且专属性强, 灵敏度高, 适用于大鼠血浆药代动力学研究。牛黄解毒片复方配伍增强了黄芩的特征成分在大鼠体内的吸收利用, 改变了黄芩特征成分的药代动力学行为。

关键词: 黄芩; 牛黄解毒片; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 高效液相色谱-串联质谱法; 比较药代动力学; 大鼠血浆

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)07-1202-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2023-0302

Comparative pharmacokinetics of characteristic components of
Scutellariae Radix in rats plasma after oral administration of
Scutellariae Radix and Niu Huang Jiedu tablets*LIU Yue-xin^{1,2}, SONG Min², HANG Tai-jun^{2**}, WU Xiao^{3**}

(1. TIPR Pharmaceutical Responsible Co., Ltd., Tianjin 300301, China; 2. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 3. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of six characteristic

* 国家自然科学基金资助项目(82104523); 江苏省自然科学基金青年基金资助项目(BK20200843); 南京中医药大学国家自然科学基金青年科学基金配套经费项目(XPT82104523)

** 通信作者 杭太俊 Tel:(025)83271090; E-mail:hangtj@cpu.edu.cn

吴骁 Tel:(025)85811357; E-mail:xwu@njucm.edu.cn

第一作者 Tel:13163006883; E-mail:liuyuexin@tjipr.com

components of *Scutellariae Radix* including baicalein, baicalin, wogonin, wogonoside, chrysin and oroxylin A in rat plasma, and to compare their pharmacokinetic profiles after oral administration of *Scutellariae Radix* and Niu Huang Jiedu tablets (NHJDT) to rats. **Methods:** Rats were given $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of NHJDT suspension or the prescribed equivalent amount of *Scutellariae Radix* aqueous extract, and plasma samples were collected at different time intervals. Naringenin was used as internal standard. After precipitated with methanol, the plasma samples were separated on an Inertsil $C_8 - 3$ ($150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) column by linear gradient elution with 0.1% formic acid solution (A) - 0.1% formic acid - methanol (B) as mobile phase. The flow rate was $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, and the column temperature was $35 \text{ }^\circ\text{C}$. The analytes were detected by tandem mass spectrometry with the electrospray ionization (ESI) source combined with multiple reaction monitoring (MRM) mode in positive ion mode. The pharmacokinetic parameters were calculated and statistically analyzed. **Results:** The six characteristic components of *Scutellariae Radix* were all in good linear relationships in the range of $5 - 500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. The RSDs for accuracy test were in the range of 88.43% - 108.6%, and the RSDs for inter - batch and intra - batch precision tests were all below 15%. The matrix effect and plasma stability met the requirements of methodology validation in biological sample analysis. Baicalin and wogonoside were the major components detected in rat plasma after oral gavage of *Scutellariae Radix* aqueous extract and NHJDT suspension. The AUC_{0-t} of wogonoside was significantly increased in NHJDT group compared with *Scutellariae Radix* group. Furthermore, the C_{max} of wogonoside and baicalin were significantly increased while the T_{max} was decreased after NHJDT suspension administration. **Conclusion:** This method is specific and sensitive for the determination of six characteristic components of *Scutellariae Radix*, and suitable for pharmacokinetic study of rat plasma. NHJDT with co - existing components enhances the absorption and influences the pharmacokinetic behaviors of active ingredients of *Scutellariae Radix*.

Keywords: *Scutellariae Radix*; Niu Huang Jiedu tablets; baicalin; wogonoside; HPLC - MS/MS; comparative pharmacokinetics; rat plasma

牛黄解毒片作为清热解毒的经典名方,已有 800 年的应用历史^[1],具有抗菌消炎作用,临床疗效确切,用于治疗实火上攻所致的咽喉肿痛及牙龈肿痛等症状。其处方以人工牛黄、雄黄、石膏、大黄、黄芩、桔梗、冰片、甘草 8 味中药组成^[2-3]。黄芩作为临床常见的清热解毒的中草药,是牛黄解毒片处方中的主要药味,是治疗呼吸道感染、肺湿热毒素滞留的要药,常与多种药物配伍使用,在新型冠状病毒肺炎的治疗中发挥了关键作用^[4]。黄芩的特征成分为黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素、汉黄芩苷、白杨素及千层纸素 A 等^[5]。关于牛黄解毒片的配伍机理研究多从降低雄黄中砷的毒性方面展开^[6],尚没有黄芩配伍后特征成分体内代谢差异的报道^[7]。而中药复方中各活性成分的药代动力学相互作用引发的药效行为是中药复方整体药效的本质。

本研究建立测定黄芩特征成分的 HPLC - MS/MS 方法,并应用该方法研究牛黄解毒片中黄芩主要成分在大鼠血浆中的经时过程,分析药代动力学特

征,并与给药单味黄芩进行比较,从药代动力学角度揭示方剂配伍中与黄芩相关的特性。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000 高效液相色谱仪、TSQ Quantum Ultra AM 型 MS/MS 联用仪 (Thermo Finnigan 公司); XW - 80C 型旋涡混合器 (上海青浦沪西仪器厂); Explorer 超纯水机 (上海沉黄科学仪器有限公司); BS21S 型十万分之一天平 (Sartorius 公司); BS110S 型万分之一天平 (Sartorius 公司); TGL - 16 台式高速冷冻离心机 (湖南湘仪仪器有限公司); 高速多功能粉碎机 (永康市天祺盛世工贸有限公司); FD - 1A - 50 型真空冷冻干燥机 (北京博医康实验仪器有限公司); KQ5200DB 型数控超声波清洗器 (中国昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

牛黄解毒片 (北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂,批号 15122090), 黄芩饮片 (江苏省中医院)。

对照品黄芩素(纯度 98.85%,批号 DST161212-024)、汉黄芩苷(纯度 98.14%,批号 DST170222-026)、千层纸素 A(纯度 98.75%,批号 DST170315-041)、柚皮素(纯度 98.76%,批号 DST160928-100)均购自成都德思特生物技术有限公司;汉黄芩素(纯度 93.3%,批号 111514-201605)、黄芩苷(纯度 93.3%,批号 110715-201318)、白杨素(纯度 93.3%,批号 111701-200501)均购自中国食品药品检定研究院。

L-抗坏血酸(纯度 99.7%,国药集团化学试剂有限公司),甲醇(色谱纯,Tedia公司),二甲亚砜(色谱纯,上海阿拉丁试剂有限公司),甲酸铵(分析纯,南京化学试剂有限公司),羧甲基纤维素钠(化学纯,南京化学试剂有限公司),肝素钠(Biosharp 生物科技公司),氯化钠注射液(安徽双鹤药业有限责任公司),超纯水(18.25 MΩ·cm,自制)。

1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠 20 只,雌雄各半,体重(200±20)g,上海杰思捷实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号为 SCXK(沪)2013-0006。动物饲养于中国药科大学药学实验动物中心,饲养温度为(23±3)℃,湿度为 40%~70%,12 h 照明。实验前禁食过夜 12 h,自由饮水。所有动物实验符合实验室动物饲料和使用指导原则,并通过中国药科大学动物试验伦理委员会的同意。

2 方法与结果

2.1 牛黄解毒片与黄芩的灌胃溶液制备

2.1.1 供试品定量分析 取牛黄解毒片适量,研磨成细粉,精密称取细粉 1 g,置于 50 mL 烧杯中,加入甲醇 25 mL,超声(40 kHz,200 W) 30 min,滤过,取续滤液待测。另取黄芩饮片 10 g 于烧杯中,加入超纯水 200 mL,煎煮 1 h,过滤,滤渣加入超纯水 100 mL,继续煎煮 1 h,过滤,合并 2 次所得滤液,-50℃冷冻干燥 24 h,得黄芩冻干粉。精密称取黄芩冻干粉 10 mg,置于 100 mL 量瓶中,加入甲醇约 80 mL 使溶解后,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,精密量取续滤液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,待测。运用 HPLC 法测定牛黄解毒片和黄芩冻干粉中各黄芩特征成分的含量。采用 Inertsustain-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)色谱柱,以 0.1% 甲酸-水为流动相 A,乙腈为流动相 B,进行梯度洗脱(0~16 min,30%B;16~18 min,30%B→40%B;18~30 min,

40%B;30~32 min,40%B→30%B;32~35 min,30%B),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 275 nm,柱温 35℃,进样量 20 μL,采用外标法计算含量。

经测定,牛黄解毒片中黄芩素含量为 1.35 μg·mg⁻¹,黄芩苷含量为 11.5 μg·mg⁻¹,汉黄芩素含量为 0.612 μg·mg⁻¹,汉黄芩苷含量为 2.52 μg·mg⁻¹,千层纸素 A 含量为 0.232 μg·mg⁻¹。黄芩冻干粉中黄芩素含量为 1.86 μg·mg⁻¹,黄芩苷含量为 201 μg·mg⁻¹,汉黄芩素含量为 4.07 μg·mg⁻¹,汉黄芩苷含量为 44.2 μg·mg⁻¹,千层纸素 A 含量为 1.12 μg·mg⁻¹。

2.1.2 灌胃溶液的制备 取牛黄解毒片 7 片,研磨成细粉,加 0.5% CMC-Na 溶液 35 mL,充分混匀制成混悬液,作为灌胃溶液。按人用临床等效日剂量换算,大鼠给药剂量为 250 mg·kg⁻¹。实际给药剂量为黄芩素 0.338 mg·kg⁻¹、黄芩苷 2.88 mg·kg⁻¹、汉黄芩素 0.153 mg·kg⁻¹、汉黄芩苷 0.63 mg·kg⁻¹、千层纸素 A 0.058 mg·kg⁻¹。

取黄芩冻干粉 61 mg,精密称定,加入生理盐水 20 mL,充分溶解制成黄芩饮片提取液,作为灌胃溶液。根据供试品定量分析结果,按黄芩苷、汉黄芩苷与牛黄解毒片给药剂量相当换算。实际给药剂量为黄芩素 0.026 mg·kg⁻¹、黄芩苷 2.87 mg·kg⁻¹、汉黄芩素 0.058 mg·kg⁻¹、汉黄芩苷 0.63 mg·kg⁻¹、千层纸素 A 0.016 mg·kg⁻¹。

2.2 动物实验

SPF 级 SD 大鼠 20 只,随机分为 2 组,每组 10 只,雌雄各半,分别灌胃黄芩饮片提取液及牛黄解毒片混悬液,于给药前 0 h 及给药后 0.05、0.083、0.167、0.5、1、2、4、8、12、16、20、22、24 h 大鼠眼内眦静脉丛取血 0.2 mL 至肝素化离心管中,4 000 r·min⁻¹离心 10 min,分取血浆置-20℃冰箱中保存待测。

2.3 溶液的配制

2.3.1 对照品储备液 精密称定黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素、汉黄芩苷、白杨素及千层纸素 A 的对照品各约 10 mg,分别置 100 mL 量瓶中,加甲醇约 80 mL 溶解后,加入 20% *L*-抗坏血酸溶液 5 mL,用甲醇稀释至刻度,配制成含 1% *L*-抗坏血酸的 0.1 mg·mL⁻¹对照品储备液。

2.3.2 内标工作液 精密称取内标柚皮素约 10 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇约 80 mL 溶解后,加入

20% *L*-抗坏血酸溶液 5 mL,用甲醇稀释至刻度,制成含 1% *L*-抗坏血酸的 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标储备液。精密量取内标储备液 1 mL,用甲醇稀释至 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,即得内标工作液。

2.3.3 混合质控溶液 精密量取黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素、汉黄芩苷、白杨素及千层纸素 A 的对照品储备液适量,用甲醇稀释成各化合物质量浓度均分别为 45、450、1 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合质控溶液。

2.4 色谱-质谱条件

2.4.1 色谱条件 采用 Inertsil C_8 -3 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,以 0.1% 甲酸水溶液(A) -

0.1% 甲酸甲醇溶液(B)为流动相,线性梯度洗脱(0~1.0 min, 35%B; 1.0~1.5 min, 35%B \rightarrow 75%B; 1.5~7.0 min, 75%B; 7.0~7.1 min, 75%B \rightarrow 35%B; 7.1~8.0 min, 35%B),流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,进样量 30 μL 。

2.4.2 质谱条件 采用电喷雾离子源,正离子检测模式(ESI⁺),喷雾电压 5 000 V,毛细管温度 350 $^{\circ}\text{C}$,鞘气(N_2)压力 40 kPa,辅助气(N_2)压力 10 kPa,碰撞气(Ar) 1.20 Pa。多级反应监测模式(MRM),6个黄芩特征成分及内标柚皮素的质谱参数见表 1。

表 1 黄芩特征成分及内标的质谱分析参数

Tab. 1 MS parameters for characteristic components of *Scutellariae Radix* and internal standard

序号(No.)	化合物(compound)	母离子(precursor ion) m/z	子离子(production) m/z	碰撞能(CE)/eV
1	白杨素(chrysin)	255.0	150.0	27
2	黄芩素(baicalein)	271.0	123.0	29
3	柚皮素(naringenin)	273.0	153.0	21
4	汉黄芩素(wogonin)	285.0	270.0	21
5	千层纸素 A(oroxylin A)	285.0	270.0	21
6	黄芩苷(baicalin)	447.0	271.0	19
7	汉黄芩苷(wogonoside)	461.0	285.0	16

2.5 血浆样品前处理

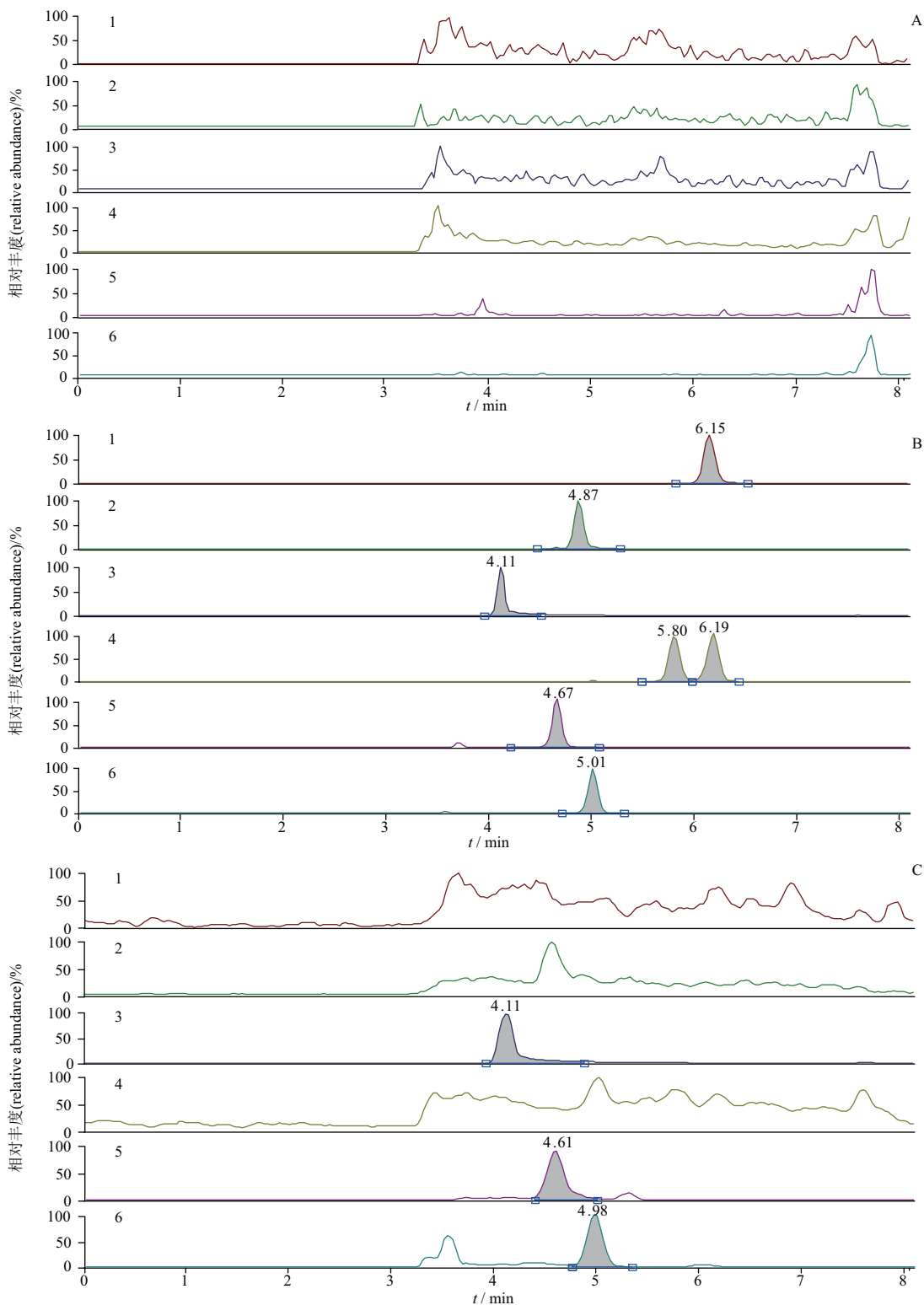
精密量取血浆样品 0.1 mL 于 2 mL 聚塑离心管中,精密加入 20% *L*-抗坏血酸溶液 40 μL 、甲醇 50 μL 及内标工作液 50 μL ,涡旋混匀 30 s,精密加入甲醇 0.3 mL,涡旋混匀 3 min,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液 37 $^{\circ}\text{C}$ 下氮吹至干,残渣加入初始比例流动相[0.1% 甲酸水溶液-0.1% 甲酸甲醇溶液(65:35)]120 μL ,涡旋混匀 3 min,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清 30 μL 待进行分析。

2.6 方法学验证

2.6.1 专属性 取大鼠空白血浆 0.1 mL,除用甲醇代替内标工作液外,其余照“2.5”项下方法操作,制得空白血浆样品溶液。精密量取黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素、汉黄芩苷、白杨素及千层纸素 A 的对照品储备液适量,用甲醇稀释成 $1 500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液;精密量取空白血浆 0.1 mL,置 2 mL 离心管中,加入 20% *L*-抗坏血酸溶液 40 μL ,精密加入混合对照品溶液 50 μL ,照“2.5”项下自“加入内标工作液 50 μL ”起操作,配制标准血浆样品溶液。取大鼠灌胃 30 min 后的血浆样品,按“2.5”项下方法制

备大鼠给药后血浆样品溶液。以上溶液按“2.4”项下条件进样测定,结果见图 1。白杨素、黄芩素、柚皮素、汉黄芩素、千层纸素 A、黄芩苷、汉黄芩苷的保留时间分别约为 6.2、4.9、4.1、5.8、6.2、4.7、5.0 min。血浆内源性物质对测定无干扰。

2.6.2 线性关系及定量限 精密量取黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素、汉黄芩苷、白杨素及千层纸素 A 的对照品储备液适量,用甲醇稀释成 15、30、60、150、300、600、900、1 200、1 500 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 系列混合对照品溶液。精密量取空白血浆 0.1 mL,置 2 mL 离心管中,加入 20% *L*-抗坏血酸溶液 40 μL ,分别精密加入各浓度混合对照品溶液 50 μL ,配制成黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素、汉黄芩苷、白杨素及千层纸素 A 质量浓度分别为 5、10、20、50、100、200、300、400、500 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准血浆样品,照“2.5”项下自“加入内标工作液 50 μL ”起操作,再按“2.4”项下条件进样测定,记录色谱图。以各成分峰面积(A_s)和内标峰面积(A_i)的比值 Y 对质量浓度($C, \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)进行权重回归($1/C^2$)。得黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素、汉黄芩苷、白杨素及千层纸素 A 的回归方程分别为



1. 白杨素 (chrysin) 2. 黄芩素 (baicalein) 3. 柚皮素 (naringenin) 4. 汉黄芩素 (wogonin)、千层纸素 A (oroxylin A) 5. 黄芩苷 (baicalin) 6. 汉黄芩苷 (wogonoside)

A. 空白血浆 (blank plasma) B. 对照品 + 空白血浆样品 (blank plasma spiked with reference substances) C. 大鼠灌胃牛黄解毒片混悬液 30 min 后的血浆样品 (plasma sample obtained 30 min after oral administration of NHJDT suspension)

图 1 黄芩特征成分和内标多反应监测色谱图

Fig. 1 Multiple reaction monitoring chromatograms of characteristic components of *Scutellariae Radix* and internal standard

$$Y = 0.00185C - 0.00119$$

$$Y = 0.00258C + 0.00806$$

$$Y = 0.0145C + 0.00941$$

$$Y = 0.00247C + 0.000160$$

$$Y = 0.00334C + 0.00550$$

$$Y = 0.0217C + 0.0222$$

结果表明,各成分线性良好,相关系数 $r \geq 0.99$; 定量限均为 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,不同浓度水平下各成分精密度良好 ($\text{RSD} < 15\%$, $n = 6$),满足定量限分析测定的要求。

2.6.3 准确度与精密度 精密量取空白血浆 0.1 mL ,置 2 mL 离心管中,加入 $20\% L$ -抗坏血酸溶液 $40 \mu\text{L}$,分别精密加入混合质控溶液 $50 \mu\text{L}$,制成 $15, 150, 400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的质控血浆样品各 6 份,照“2.5”项下自“加入内标工作液 $50 \mu\text{L}$ ”起操作得质控样品溶液,1 个分析批内测定 6 次,计算批内变异。不同分析批测定 3 次,计算批间变异。结果如表 2 所示,各成分准确度在 $88.43\% \sim 108.6\%$,精密度 $\text{RSD} (n = 6) < 14\%$ 。准确度与精密度均符合生物样品的测定要求。

表 2 黄芩特征成分的准确度与精密度

Tab. 2 Precision and accuracy of characteristic components of *Scutellariae Radix*

分析物 (analyte)	浓度 (concentration)/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	批间(inter-batch) ($n = 18$)			批内(intra-batch) ($n = 6$)		
		实测值 (determined)	准确度 (accuracy)	精密度 (precision)	实测值 (determined)	准确度 (accuracy)	精密度 (precision)
		$\pm \text{SD}/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	RE/%	RSD/%	$\pm \text{SD}/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	RE/%	RSD/%
黄芩素(baicalein)	15.09	13.77 \pm 1.245	91.25	9.0	13.94 \pm 0.7269	92.97	5.2
	150.9	139.3 \pm 8.425	92.32	6.0	142.6 \pm 7.872	95.06	5.5
	402.4	356.0 \pm 45.49	88.46	12.8	377.4 \pm 9.341	94.35	2.5
黄芩苷(baicalin)	15.21	14.87 \pm 1.079	97.78	7.3	14.80 \pm 0.3362	98.69	2.3
	152.1	142.9 \pm 4.357	93.94	3.0	144.3 \pm 6.312	96.18	4.4
	405.6	358.7 \pm 38.66	88.43	10.8	376.9 \pm 10.89	94.22	2.9
汉黄芩素(wogonin)	15.12	16.17 \pm 1.363	106.9	8.4	15.53 \pm 0.3783	103.6	2.4
	151.2	155.1 \pm 6.521	102.6	4.2	152.3 \pm 12.03	101.6	7.9
	403.2	382.9 \pm 4.815	94.97	1.3	381.4 \pm 11.00	95.34	2.9
汉黄芩苷(wogonoside)	15.09	15.47 \pm 1.508	102.5	9.7	14.76 \pm 0.6233	98.39	4.2
	150.9	150.4 \pm 16.20	99.69	10.8	144.3 \pm 4.782	96.23	3.3
	402.4	388.6 \pm 19.63	96.56	5.1	387.4 \pm 11.58	96.86	3.0
白杨素(chrysin)	15.03	16.18 \pm 0.8469	107.7	5.2	15.93 \pm 0.3273	106.2	2.1
	150.3	160.3 \pm 13.44	106.7	8.4	159.6 \pm 7.853	106.4	4.9
	400.8	386.6 \pm 13.69	96.47	3.5	382.0 \pm 12.98	95.49	3.4
千层纸素 A(oroxylin A)	15.12	16.43 \pm 0.7786	108.6	4.7	16.14 \pm 0.4976	107.6	3.1
	151.2	157.0 \pm 21.40	103.8	13.6	156.5 \pm 9.520	104.3	6.1
	403.2	375.7 \pm 40.32	93.19	10.7	374.5 \pm 14.74	93.61	3.9

2.6.4 基质效应和提取回收率 精密量取甲醇 0.1 mL ,置 2 mL 离心管中,加入 $20\% L$ -抗坏血酸溶液 $40 \mu\text{L}$,分别精密加入混合质控溶液 $50 \mu\text{L}$,照“2.5”项下自“加入内标工作液 $50 \mu\text{L}$ ”起操作,即得基质效应对照溶液,进样测定,记录待测成分峰面积 (A_s) 和内标峰面积 (A_r) 的比值为 A 。取空白血浆 0.1 mL ,置 2 mL 离心管中,加入甲醇 0.3 mL ,涡旋混匀 3 min , $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,取上清液加入

$20\% L$ -抗坏血酸溶液 $40 \mu\text{L}$,分别精密加入混合质控溶液 $50 \mu\text{L}$ 及内标工作液 $50 \mu\text{L}$,涡旋混匀 30 s ,照“2.5”项下自“ $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下氮吹至干”起同法操作,即得基质效应样品溶液,进样测定,记录待测成分峰面积 (A_s) 和内标峰面积 (A_r) 的比值为 B 。按 $B/A \times 100\%$ 计算基质效应因子。

照“2.6.3”项下方法分别配制质量浓度为 $15, 150, 400 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的质控血浆样品,照“2.5”项下自

“加入内标工作液 50 μL ”起操作,即得提取回收率样品溶液,进样测定峰面积,根据与基质效应样品溶液峰面积的比值计算提取回收率。基质效应和提取回

收率结果见表 3,在低、中、高不同浓度水平下,质控样品的基质效应和提取回收率稳定,符合生物样本定量分析的要求。

表 3 黄芩特征成分的基质效应与提取回收率 ($n=6$)

Tab. 3 Matrix effect and extraction recovery of characteristic components of *Scutellariae Radix*

分析物 (analyte)	浓度 (concentration)/(ng · mL ⁻¹)	基质效应 (matrix effect) \pm SD/%	RSD/ %	提取回收率 (extraction recovery) \pm SD/%	RSD/ %
黄芩素 (baicalein)	15.09	104.5 \pm 10.12	9.7	44.43 \pm 1.699	3.8
	150.9	91.84 \pm 4.873	5.3	47.20 \pm 3.777	8.0
	402.4	86.09 \pm 2.317	2.7	61.79 \pm 7.136	11.6
黄芩苷 (baicalin)	15.21	86.69 \pm 5.512	6.4	89.09 \pm 7.151	8.0
	152.1	100.0 \pm 3.262	3.3	77.25 \pm 1.985	2.6
	405.6	92.88 \pm 3.444	3.7	99.36 \pm 10.83	10.9
汉黄芩素 (wogonin)	15.12	124.2 \pm 5.661	4.6	79.39 \pm 2.462	3.1
	151.2	127.2 \pm 6.799	5.3	78.27 \pm 3.192	4.1
	403.2	108.9 \pm 3.236	3.0	94.19 \pm 10.55	11.2
汉黄芩苷 (wogonoside)	15.09	101.8 \pm 5.216	5.1	51.49 \pm 3.338	6.5
	150.9	105.9 \pm 6.621	6.3	49.84 \pm 2.619	5.3
	402.4	99.96 \pm 3.172	3.2	66.42 \pm 7.652	11.5
白杨素 (chrysin)	15.03	126.6 \pm 14.29	11.3	73.21 \pm 2.570	3.5
	150.3	117.3 \pm 9.921	8.5	76.91 \pm 4.314	5.6
	400.8	97.35 \pm 4.238	4.4	89.27 \pm 10.77	12.1
千层纸素 A (oroxylin A)	15.12	117.8 \pm 5.226	4.4	79.05 \pm 5.409	6.8
	151.2	122.2 \pm 10.90	8.9	79.42 \pm 2.792	3.5
	403.2	101.8 \pm 3.638	3.6	96.42 \pm 12.74	13.2

2.6.5 稳定性 取“2.3.3”项下配制的 45、1 200 ng · mL⁻¹混合质控溶液 50 μL ,加入空白血浆 0.1 mL,配成高、低 2 种浓度的质控血浆样品各 3 份。分别进行在室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 放置 8 h 稳定性、-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻至少 24 h - 室温解冻循环 3 次稳定性、质控血浆样品处理后在进样器 (15 $^{\circ}\text{C}$) 放置 24 h 的稳定性进行考察,结果见表 4。黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素、汉黄芩苷、白杨素和千层纸素 A 浓度均无明显变化,稳定性良好。

2.7 药代动力学试验

取 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存的血浆样品,室温下融化,按“2.5”项下方法处理并测定。血浆中仅检测到黄芩苷及汉黄芩苷 2 个成分,其平均血药浓度 - 时间曲线见图 2。所得数据经 WinNonlin 7.0 软件计算药代动力学参数,SPSS 独立样本 t 检验分析,结果见表 5。

3 讨论

3.1 检测方法的开发

目前,黄芩的体内代谢分析主要为黄芩素、黄芩苷

等单一成分的测定,无法实现黄芩多种特征成分的同时测定。本文采用 HPLC - MS/MS 法同时测定大鼠血浆中黄芩的 6 个特征成分,为更完整地评估黄芩药代动力学行为提供了有效途径。本研究对大鼠血浆样本前处理方法及色谱条件进行了优化,比较了甲醇沉淀、乙腈沉淀、二氯甲烷 - 四甲基叔丁基醚 (1:2) 的液 - 液萃取法 3 种前处理方法,结果显示血浆样本经甲醇沉淀提取效率高,重现性好。处理过程中加入 20% L - 抗坏血酸溶液,防止黄酮类成分在前处理操作中被氧化^[8]。另外,对色谱条件进行了优化,考察了使用甲醇或乙腈作为有机相、流动相中加入甲酸或甲酸铵及色谱柱种类对黄芩各特征成分保留时间、峰形及响应的影响,以增强分离效果、缩短分析时间及提高灵敏度。最终确定了以 0.1% 甲酸水溶液 - 0.1% 甲酸甲醇溶液为流动相,Inertsil C₈ - 3 色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 为最佳色谱条件。由于黄芩素及汉黄芩苷在血浆中的稳定性较差,导致二者回收率偏低,研究结果与文献报道^[9-11]相符。

表 4 黄芩特征成分在不同条件下的稳定性 (n=3)

Tab. 4 Stability of characteristic components of Scutellariae Radix under different conditions

分析物 (analyte)	浓度 (concentration)/ (ng · mL ⁻¹)	实测值(determined)/(ng · mL ⁻¹)		
		进样器 (autosampler) 15 °C	冻融 3 次 (three freeze - thaw cycles)	室温 (room - temperature) 25 °C
黄芩素 (baicalein)	15.09	15.66 ± 1.426	16.59 ± 3.349	14.16 ± 1.687
	402.4	381.3 ± 11.66	385.9 ± 23.35	382.0 ± 29.82
黄芩苷 (baicalin)	15.21	15.25 ± 4.182	17.90 ± 3.279	15.63 ± 2.032
	405.6	354.4 ± 14.61	404.1 ± 24.19	375.8 ± 21.98
汉黄芩素 (wogonin)	15.12	15.01 ± 0.5619	16.88 ± 1.798	15.26 ± 1.500
	403.2	370.2 ± 17.23	362.8 ± 17.71	368.9 ± 16.40
汉黄芩苷 (wogonoside)	15.09	14.51 ± 1.324	14.90 ± 1.307	12.88 ± 1.637
	402.4	359.3 ± 13.79	387.2 ± 23.55	369.8 ± 16.13
白杨素 (chrysin)	15.03	12.76 ± 0.640 5	15.60 ± 1.156	14.73 ± 1.057
	400.8	380.7 ± 13.70	328.2 ± 9.806	337.1 ± 7.657
千层纸素 A (oroxilin A)	15.12	12.57 ± 0.660 7	16.11 ± 1.533	15.13 ± 0.9541
	403.2	380.2 ± 14.50	340.9 ± 7.871	343.6 ± 8.498

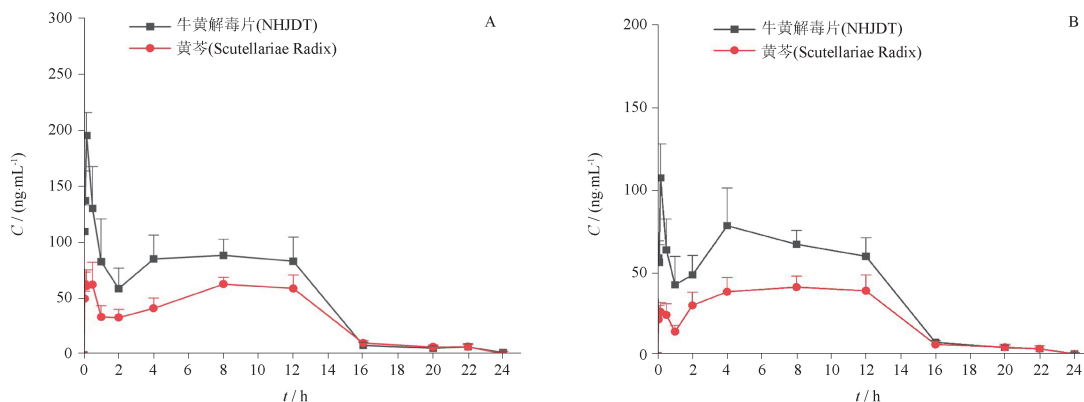


图 2 10 只大鼠灌胃黄芩饮片提取液及牛黄解毒片混悬液后黄芩苷(A)与汉黄芩苷(B)平均血药浓度-时间曲线

Fig. 2 Mean plasma concentration - time profiles of baicalin (A) and wogonoside (B) in 10 rats after oral administration of Scutellariae Radix aqueous extract and NHJDT suspension, respectively

表 5 大鼠灌胃黄芩饮片提取液及牛黄解毒片混悬液后黄芩苷与汉黄芩苷药代动力学参数 (n=10)

Tab. 5 Pharmacokinetic parameters of baicalin and wogonoside in rats after oral administration of Scutellariae Radix aqueous extract and NHJDT suspension, respectively

参数 (parameter)	黄芩苷 (baicalin)		汉黄芩苷 (wogonoside)	
	黄芩饮片提取液 (Scutellariae Radix aqueous extract)	牛黄解毒片混悬液 (NHJDT suspension)	黄芩饮片提取液 (Scutellariae Radix aqueous extract)	牛黄解毒片混悬液 (NHJDT suspension)
$C_{max}/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	93.51 ± 17.53 *	225.2 ± 31.09 *	56.62 ± 10.04 *	120.0 ± 24.37 *
T_{max}/h	7.317 ± 1.610 *	0.171 8 ± 0.039 22 *	8.850 ± 1.269 *	2.505 ± 1.339 *
$T_{1/2}/\text{h}$	11.62 ± 3.047	5.795 ± 0.851 4	17.81 ± 6.363	8.105 ± 2.203
$AUC_{0-t}/(\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1})$	785.5 ± 112.7	1 223 ± 249.4	529.1 ± 95.96 *	932.5 ± 141.4 *
$AUC_{0-\infty}/(\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1})$	1 082 ± 135.6	1 429 ± 288.5	943.5 ± 150.6	995.3 ± 83.61
MRT/h	8.239 ± 0.472 5	7.341 ± 0.319 5	7.951 ± 0.427 2	7.632 ± 0.317 9

注 (note): * $P < 0.05$, 牛黄解毒片组与黄芩组比较 (NHJDT group vs Scutellariae Radix group)

3.2 采样点的设计

在预实验中,黄芩苷及汉黄芩苷均在 10 min 内出现首个吸收峰,并在 24 h 时,血药浓度均已远低于达峰浓度的 1/10,参考相关黄酮类药代动力学现有文献的采样时间^[12-13],本研究拟在 10 min 内设计较密集的采样点,采样终点设置为 24 h,最终选用了给药前 0 h 及给药后 0.05、0.083、0.167、0.5、1、2、4、8、12、16、20、22、24 h 的采样点。

3.3 药动学特征讨论

研究结果表明,大鼠灌胃黄芩饮片提取液或牛黄解毒片混悬液后,血浆中仅检测出黄芩苷及汉黄芩苷 2 个成分,其他成分由于血浆浓度较低均未检出。牛黄解毒片及黄芩饮片含量测定结果表明,黄芩中主要成分为黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素及汉黄芩苷,其他黄酮类成分均含量较低或未检出。另有文献报道表明,黄芩素及汉黄芩素在体循环中主要以 II 相代谢产物的形式存在,即通过黄酮羟基上的取代反应,生成葡糖醛酸苷、硫酸酯及其他 II 相代谢产物,其中黄芩苷及汉黄芩苷含量最高^[14-16]。

中药复方成分复杂,各成分之间存在显著的相互作用,不仅表现为药效动力学的差异,也体现在药代动力学行为的变化。文献报道,很多中药代谢吸收的药代动力学曲线不是经典的房室模型,不具有线性药代动力学特征,在缓慢吸收的同时也伴随代谢和排泄的过程,造成吸收相和代谢相的药时曲线相对平缓^[6,17-18]。本研究结果表明,黄芩苷及汉黄芩苷在大鼠体内呈明显双峰现象,是非线性药代动力学特征,与文献报道^[19-20]一致,基于此,为保证实验结果的准确性,药代动力学结果在以 C_{\max} 和 T_{\max} 判定的基础上,通过 AUC 进一步分析佐证。

与黄芩饮片提取液相比,大鼠口服牛黄解毒片混悬液后,黄芩苷及汉黄芩苷的首个吸收峰的吸收程度明显增强,远高于第 2 个吸收峰,致使黄芩苷及汉黄芩苷的 T_{\max} 分别降低了 98% 与 72%。除此之外,与黄芩饮片提取液比较,大鼠口服牛黄解毒片混悬液后,血浆中汉黄芩苷的 AUC_{0-t} 增加了 76%,黄芩苷及汉黄芩苷的 C_{\max} 分别增加了 141% 与 112%。牛黄解毒片复方配伍后显著提高了黄芩有效成分的吸收利用,加快了吸收速率。已有文献报道,雄黄与黄芩配伍,可通过降低细胞膜渗透性抑制黄芩苷、黄芩素的体内代谢,延长作用时间^[21]。大黄与黄芩配伍,可以抑制炎症介质 IL-6, IL-1, TNF- α 的释

放,从而提高黄芩的抗炎效果^[22]。这些结果也进一步验证了复方配伍对黄芩主要活性成分存在显著影响的现象。本研究揭示了黄芩特征成分在配伍药物作用下的体内药代动力学行为,为指导黄芩临床合理用药及配伍相关研究提供参考依据。

参考文献

- [1] 刘明昕, 吴晓, 芙蓉, 等. 大黄及牛黄解毒片大鼠给药后血浆中大黄活性成分的药代动力学比较研究[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(4): 449
LIU YX, WU X, GUAN R, et al. Comparative pharmacokinetics of active anthraquinones ingredients after oral administration of Rhei Radix et Rhizoma and Niu Huang Jiedu tablets to rats[J]. J China Pharm Univ, 2018, 49(4): 449
- [2] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 694
ChP 2020. Vol I [S]. 2020: 694
- [3] 金鹏飞, 梁晓丽, 夏路风, 等. ICP-MS 研究牛黄解毒片中 20 种微量元素的总量及在水和胃肠液中的溶出特性[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(6): 985
JIN PF, LIANG XL, XIA LF, et al. Study on total contents of 20 trace elements in Niu Huang Jiedu tablets and their extract rates in water and gastrointestinal fluids by ICP-MS[J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34(6): 985
- [4] LIU HB, YE F, SUN Q, et al. Scutellaria baicalensis extract and baicalein inhibit replication of SARS-CoV-2 and its 3C-like protease *in vitro*[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2021, 36(1): 497
- [5] 郭玲玲, 刘毅, 禄梦杰, 等. HPLC 法同时测定陕西产不同生长年限野生和栽培黄芩中 9 种化学成分的含量[J]. 中草药, 2018, 49(4): 935
GUO LL, LIU Y, LU MJ, et al. Simultaneous determination of nine components of Scutellaria baicalensis in different habitats and growth years by HPLC[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2018, 49(4): 935
- [6] WU X, WU SH, LIU YX, et al. Health risk assessment of arsenic in Realgar and Niu Huang Jie Du tablets based on pharmacokinetic study[J]. J Trace Elem Med Biol, 2018, 48: 81
- [7] 黄玉普, 吴大章, 王森. 黄芩的药理作用及其药对研究进展[J]. 中国药业, 2022, 31(15): 129
HUANG YP, WU DZ, WANG S. Research progress on pharmacological action of Scutellariae Radix and its drug pair[J]. China Pharm, 2022, 31(15): 129
- [8] FENG Z, ZHOU J, SHANG X, et al. Comparative research on stability of baicalin and baicalein administrated in monomer and total flavonoid fraction form of Radix Scutellariae in biological fluids *in vitro*[J]. Pharm Biol, 2017, 55(1): 1177
- [9] 刘廷, 狄留庆, 李娟, 等. 双黄连制剂中酚酸与黄酮类成分的含量测定及药代动力学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(18): 82

- LIU T, DI LQ, LI J, *et al.* Determination and pharmacokinetic analysis of phenolic acids and flavonoids after oral administration of Shuanghuanglian preparation by UPLC – MS/MS[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2016, 22(18): 82
- [10] 赵宏兴, 王鑫, 刘有平, 等. LC – MS/MS 法研究加味左金丸在大鼠体内的药动学[J]. *沈阳药科大学学报*, 2021, 38(7): 668
- ZHAO HX, WANG X, LIU YP, *et al.* Study on the pharmacokinetics of Jiawei Zuojin Wan in rats using LC – MS/MS[J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2021, 38(7): 668
- [11] 杨培, 林龙飞, 田宇, 等. 生物样品测定分析方法中提取回收率的探讨[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(3): 722
- YANG P, LIN LF, TIAN Y, *et al.* Discussion of recovery in biological sample determination methodology[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2015, 30(3): 722
- [12] 林龙飞, 陈功森, 李慧, 等. 黄芩 – 黄连煎煮共沉淀的物质基础、形貌以及对煎煮液体内过程的影响研究[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(21): 5790
- LIN LF, CHEN GS, LI H, *et al.* Composition and morphology of *Scutellariae Radix – Coptidis Rhizoma* decoction co – precipitate and effect on *in vivo* behavior of decocting liquid[J]. *China J Chin Mater Med*, 2023, 48(21): 5790
- [13] 周严严, 顾欣如, 李涛, 等. 蒲地蓝消炎口服液活性成分在大鼠体内的药代动力学过程及对肝脏药物代谢酶的影响[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(22): 4932
- ZHOU YY, GU XR, LI T, *et al.* Pharmacokinetics of active ingredients of Pudilan Xiaoyan oral liquid in rats and effect on liver drug – metabolizing enzymes[J]. *China J Chin Mater Med*, 2019, 44(22): 4932
- [14] 郑蓉, 张淇淞, 胡雪黎, 等. 多药耐药相关蛋白 2 对汉黄芩素及其主要 II 相代谢产物药动学特征的影响[J]. *中草药*, 2022, 53(21): 6779
- ZHENG R, ZHANG QS, HU XL, *et al.* Effect of multidrug resistance protein 2 on pharmacokinetics of wogonin and its major phase II metabolites[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(21): 6779
- [15] 汤泓, 汤丽玲, 徐瑞娟, 等. 部分黄酮类化合物的 II 相代谢产物及其药理活性研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2012, 21(2): 144
- TANG H, TANG LL, XU RJ, *et al.* Phase II metabolites of several flavonoids and their pharmacological activities[J]. *Chin J New Drugs*, 2012, 21(2): 144
- [16] 杨迪, 袁婷婷, 干舒蕾, 等. 静脉注射黄芩苷、黄芩素在大鼠体内的药代规律比较研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2017, 22(4): 394
- YANG D, YUAN TT, GAN SL, *et al.* Comparative study on pharmacokinetics of baicalin and baicalin after intravenous injection in rats[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2017, 22(4): 394
- [17] WU X, YAN RN, GUAN R, *et al.* Arsenic – related health risk assessment of realgar – containing Niu Huangjiedu tablets in healthy volunteers *po* administration [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 12: 761801
- [18] 朱慧琳, 林超, 彭琳秀, 等. 大鼠肠道菌群对雄黄中砷体内行为的影响研究[J]. *药物分析杂志*, 2021, 42(7): 43
- ZHU HL, LIN C, PENG LX, *et al.* Effects of rat gut microbiota on the behavior of Realgar *in vivo*[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2021, 42(7): 43
- [19] 闫晶超, 刘兆明, 王天明, 等. 泻心汤黄酮类成分在大鼠体内的药代动力学研究[J]. *药学报*, 2007, 42(7): 722
- YAN JC, LIU ZM, WANG TM, *et al.* Pharmacokinetics of flavonoids from Xiexin decoction in rats[J]. *Acta Pharm Sin*, 2007, 42(7): 722
- [20] 李涛, 王怡薇, 王彦礼, 等. 黄芩汤血浆中多成分 LC – MS 法测定及其药代动力学特征研究[J]. *药学报*, 2013, 48(6): 917
- LI T, WANG YW, WANG YL, *et al.* LC – MS quantification and pharmacokinetics of the multi – constituents of Huangqin Tang in rat plasma after different single oral doses[J]. *Acta Pharm Sin*, 2013, 48(6): 917
- [21] 金维缘. HPLC – MS 测定黄酮类成分分析方法的建立及其在雄黄 – 黄芩药动学研究中的应用[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2020
- JIN WY. Establishment of an HPLC – MS Method for the Determination of Flavonoids and Its Application in the Pharmacokinetic Study on Realgar and *Scutellaria* Combinations [D]. Shenyang: China Medical University, 2020
- [22] 王沛明, 陈文, 张祎, 等. 基于 p38MAPK 通路初探大黄黄芩配伍对内毒素血症模型大鼠肝脏炎症的调节机制[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(18): 3425
- WANG PM, CHEN W, ZHANG Y, *et al.* Mechanism of Rhei Radix et Rhizoma combined with *Scutellariae Radix* on liver inflammation in rats with endotoxin disease based on p38MAPK pathway [J]. *China J Chin Mater Med*, 2016, 41(18): 3425

(本文于 2024 年 3 月 18 日修改回)