

## 急性肝损伤对黄芩苷镁在大鼠体内药代动力学和组织分布的影响

江慧, 刘翠哲\*, 常金花\*

(承德医学院, 河北省中药研究与开发重点实验室, 河北承德 067000)

**[摘要]** 目的:建立一种可同时测定大鼠血浆和组织中黄芩苷镁和黄芩素的高效液相色谱法(HPLC);考察急性肝损伤对黄芩苷镁在大鼠体内药代动力学和组织分布特征的影响。方法:采用四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )诱导大鼠急性肝损伤模型;正常大鼠和急性肝损伤模型大鼠灌胃给予等剂量( $287.31 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )黄芩苷镁水溶液后,在不同时间点眼眶取血,采用HPLC同时测定各时间点大鼠血浆中黄芩苷镁和黄芩素的药物浓度,绘制药-时曲线,利用DAS 3.0软件计算药代动力学参数,应用SPSS 23.0进行统计学分析;灌胃给予黄芩苷镁水溶液后,运用HPLC同时测定黄芩苷镁和黄芩素在不同时间点收集的大鼠肝、肺、肾、胃、脑、小肠中的含量,流动相0.1%磷酸水溶液-甲醇,检测波长278 nm。结果:黄芩苷镁在急性肝损伤模型组大鼠的药峰浓度( $C_{\text{max}}$ )是正常组的0.58倍,药时曲线下面积( $\text{AUC}_{0-t}$ )是正常组的0.5倍( $P<0.05$ ),表观分布容积( $V_d$ )是正常组的2.3倍( $P<0.05$ ),血浆中几乎检测不到黄芩素。黄芩苷镁在急性肝损伤模型组大鼠的肝、胃、脑中各时间点的质量分数均高于正常组,而在肺8 h,肾8, 12 h,小肠0.333 h样品中黄芩苷镁的质量分数低于正常组;黄芩素在模型组大鼠的肺、胃、小肠中各时间点的质量分数均高于正常组,而在肝6, 8 h,肾0.333, 4, 6 h组织样品中黄芩素的质量分数低于正常组,在脑中几乎检测不到黄芩素。结论:大鼠灌胃等剂量的黄芩苷镁水溶液后, $\text{CCl}_4$ 诱导的急性肝损伤可以影响黄芩苷镁在大鼠体内的药代动力学行为和组织分布特征,而且黄芩苷镁和黄芩素在肝、肺、肾、胃、小肠组织中存在生物转化。

**[关键词]** 黄芩苷镁;黄芩素;四氯化碳( $\text{CCl}_4$ );急性肝损伤;药代动力学;组织分布;高效液相色谱法(HPLC)

**[中图分类号]** R22;R28;R96;R256.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)05-0116-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211847 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210727.1336.002.html>

**[网络出版日期]** 2021-07-27 14:33

### Effect of Acute Liver Injury on Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Baicalin Magnesium in Rats

JIANG Hui, LIU Cui-zhe\*, CHANG Jin-hua\*

(Hebei Province Key Laboratory of Research and Development for Chinese Medicine,  
Chengde Medical University, Chengde 067000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) for simultaneous determination of baicalin magnesium and baicalein in rat plasma and tissues, and to investigate the effect of acute liver injury on pharmacokinetics and tissue distribution of baicalin magnesium in rats. **Method:** Acute liver injury rat model was induced by carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ). Normal rats and acute liver injury model rats were given an equal dose ( $287.31 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) of baicalin magnesium aqueous solution by intragastric administration, the orbital blood was collected at different time points, and HPLC was used to simultaneously

**[收稿日期]** 20210429(010)

**[基金项目]** 河北省科技厅“技术创新引导专项-科技工作会商”项目(2020ZX-05);河北省中央引导地方科技发展资金项目——科技创新基地项目(216Z2502G)

**[第一作者]** 江慧,在读硕士,从事中药制剂现代化研究,E-mail:jianghui0469@163.com

**[通信作者]** \*刘翠哲,博士,研究员,从事中药制剂现代化研究,Tel:0314-2291142,E-mail:liucuihexy@163.com;

\*常金花,硕士,副教授,从事中药制剂现代化研究,E-mail:xiaoniqu@126.com

determine the concentrations of baicalin magnesium and baicalein in rat plasma at each time point, the concentration-time curves were drawn, the pharmacokinetic parameters were calculated with DAS 3.0, and SPSS 23.0 was used for statistical analysis. After oral administration of baicalin magnesium aqueous solution, HPLC was used to simultaneously determine the contents of baicalin magnesium and baicalein in rat liver, lung, kidney, stomach, brain and small intestine at different time points, the mobile phase was 0.1% phosphoric acid aqueous solution-methanol, and the detection wavelength was 278 nm. **Result:** In the acute liver injury model group, the peak concentration ( $C_{max}$ ) of baicalin magnesium was 0.58 times that of the normal group, the area under concentration-time curve ( $AUC_{0-t}$ ) was 0.5 times that of the normal group ( $P<0.05$ ), the apparent volume of distribution ( $V_d$ ) was 2.3 times that of the normal group ( $P<0.05$ ), and baicalein is almost undetectable in plasma. The content of baicalin magnesium in liver, stomach and brain of the acute liver injury model group was higher than that of the normal group at each time point, while the content of baicalin magnesium in the samples of lung at 8 h, kidney at 8 h and 12 h, and small intestine at 0.333 h was lower than that of the normal group. The content of baicalein in lung, stomach and small intestine of the model group was higher than that of the normal group at each time point, while the content of baicalein in the tissue samples of liver at 6, 8 h and kidney at 0.333, 4, 6 h was lower than that in the normal group, and baicalein could hardly be detected in the brain. **Conclusion:** After intragastric administration of the same dose of baicalin magnesium aqueous solution, acute liver injury induced by  $CCl_4$  can affect the pharmacokinetics and tissue distribution characteristics of baicalin magnesium in rats, and there is biotransformation of baicalin magnesium and baicalein in liver, lung, kidney, stomach and small intestine.

**[Keywords]** baicalin magnesium; baicalein; carbon tetrachloride ( $CCl_4$ ); acute liver injury; pharmacokinetics; tissue distribution; high performance liquid chromatography (HPLC)

黄芩为唇形科植物黄芩的干燥根<sup>[1]</sup>,传统用法为水煎煮。黄芩苷是黄芩中的主要有效成分之一,市场上销售的黄芩苷原料多通过水提酸沉的方法制得。黄芩苷是一种药理作用广泛的黄酮类化合物,其对病毒性肝炎、酒精性肝病、化学性肝损伤、肝纤维化等肝脏疾病均具有一定的保护作用<sup>[2-4]</sup>,但其难溶于水。目前,有单方制剂黄芩苷片和黄芩苷胶囊应用于临床,用于急慢性肝炎和迁延性肝炎的辅助治疗。而且在2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)收录的中药制剂处方中,含黄芩的中药制剂已有多重用黄芩苷代替黄芩药材投料,如清开灵注射液、银黄颗粒、银黄口服液和三黄片等<sup>[5]</sup>。黄芩苷水溶性差、口服生物利用度低已是业界共识。国内外已有大量文献报道用药剂学和结构修饰等手段提高黄芩苷的溶解度和生物利用度<sup>[6-7]</sup>。然而,这些方法的工艺复杂,不适合工业化生产。

本课题组前期研究发现在黄芩水煎液中,黄芩苷的含量明显高于其溶解度。深入研究发现黄芩苷在黄芩中的存在形式为黄芩苷镁盐,并证实黄芩苷提取工艺中的酸沉步骤使黄芩苷由镁盐形式转化为分子形式,导致其溶解度大大降低。镁离子是

一种参与生物体正常生命活动及新陈代谢必不可少的元素,参与细胞的多种生物功能。提示黄芩苷镁盐更能代表黄芩药材的药理作用。经过多年的研究,本课题组成功获得了黄芩苷镁单体化合物,其溶解度明显高于黄芩苷,相关研究已获得多个专利授权<sup>[8-9]</sup>。由于黄芩苷镁水溶性好,本课题组前期对其药代动力学、组织分布<sup>[10]</sup>及药效进行了研究,结果发现大鼠尾静脉注射黄芩苷镁后,其对四氯化碳( $CCl_4$ )诱导的急性肝损伤具有保护作用,且药效优于等摩尔浓度的黄芩苷<sup>[11]</sup>。

与注射剂相比,口服给药时患者的顺应性更好,更易于被临床接受。故前期对灌胃黄芩苷镁在正常大鼠体内的药物动力学进行了研究<sup>[12]</sup>。但有文献报道病理状态会影响药物的吸收、分布、代谢和排泄,使其药物动力学参数表现出明显差异<sup>[13-15]</sup>。因此,对机体在病理状态下的药理学参数和组织分布特征的研究比在正常状态下更加重要,且与临床更为相关。预试验发现大鼠灌胃黄芩苷镁后,在肝组织中可以检测到黄芩素,故本研究拟同时测定大鼠血浆和组织中黄芩苷镁和黄芩素的浓度,考察灌胃等剂量的黄芩苷镁后,其在正常和急性肝损伤大鼠体内的药理学参数和组织分布特征,验证黄芩苷

镁和黄芩素在大鼠体内是否存在生物转化,进而丰富黄芩苷镁的药物动力学研究内容,并为黄芩苷镁口服给药系统肝脏保护作用的研究提供实验依据。

## 1 材料

1260 Infinity II型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),MSE125P型1/10万电子分析天平(德国赛多利斯集团),Velocity 14R型高速低温离心机(澳大利亚生命动力有限公司),MS3DS25型涡旋仪(德国艾卡仪器设备有限公司),DW-HL528S型超低温冰箱(中科美菱低温科技股份有限公司),RM2235型石蜡切片机和EG1150型石蜡包埋机(德国Leica公司),Excelsior TMES型自动组织脱水机和Multiskan MK3型酶标仪(美国赛默飞公司),BX53型显微镜(日本奥林巴斯公司),HSC-12A型氮气吹干仪(天津市恒奥科技发展有限公司),Scientz-48型高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

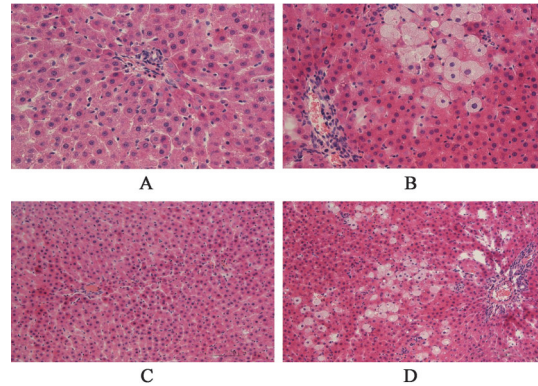
黄芩苷镁[自制,经高效液相色谱法(HPLC)检测,纯度74.99%],黄芩苷、黄芩素、染料木素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110715-201821,111595-201808,111704-201703,纯度依次为95.4%,97.9%,99.5%),CCl<sub>4</sub>(天津欧博凯化工产品销售有限公司,批号20171212),橄榄油[益海(广州)粮油工业有限公司,批号20200412],丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20200925,20200924),苏木素-伊红(HE)染色液(珠海贝索生物技术有限公司,批号20190216),水为娃哈哈纯净水,甲醇、乙腈、乙酸乙酯、磷酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF级SD雄性大鼠,体质量(280±20)g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0008。大鼠在屏障动物房检疫室饲养1周后,转到屏障动物房,严格按照实验动物护理和使用指南的原则饲养,本实验所涉及的动物实验经承德医学院实验动物伦理委员会批准,批准号LAC-2020-004。

## 2 方法与结果

**2.1 CCl<sub>4</sub>诱导大鼠急性肝损伤模型的评价** 正常组大鼠ALT与AST活性分别为(24.58±4.65), (16.55±2.55) U·L<sup>-1</sup>,模型组大鼠ALT与AST活性分别为(142.85±35.66), (101.23±34.93) U·L<sup>-1</sup>。与正常组大鼠比较,模型组大鼠血清中ALT和AST活性均显著增加( $P<0.01$ );肝组织病理切片表现出明显

的肝细胞气球样病变,细胞核的正常形态消失,局部出现灶状坏死,以及炎细胞浸润等肝损伤特征,见图1。上述结果说明肝损伤造模成功。



A. 正常组(×400);B. 模型组(×400);C. 正常组(×200);D. 模型组(×200)

图1 大鼠造模前后肝组织的病理切片观察(HE)

Fig. 1 Observation of pathological sections of liver tissue in rats before and after modeling (HE)

## 2.2 正常和肝损伤模型大鼠的药代动力学研究

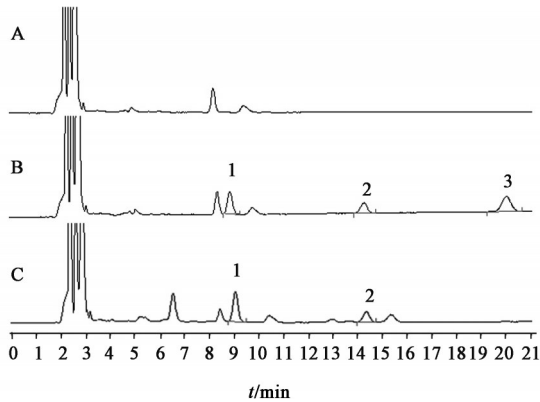
**2.2.1 色谱条件** 采用Gemini C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相0.1%磷酸水溶液-甲醇(44:56),流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温30 °C,进样量10 μL,检测波长278 nm。

**2.2.2 溶液的配制** 分别精密称取黄芩苷和黄芩素对照品10.27, 10.64 mg,分别置于25 mL量瓶中,加甲醇超声(功率300 W,频率40 kHz,下同)使溶解并定容,作为储备液。分别精密移取上述储备液适量,加甲醇按倍数稀释,得质量浓度为黄芩苷1.027~410.8 mg·L<sup>-1</sup>和黄芩素1.06~424 mg·L<sup>-1</sup>的系列单独对照品溶液,4 °C保存。精密称取染料木素对照品10.33 mg,置于10 mL量瓶中,加甲醇超声使溶解并定容,作为内标储备液。精密移取该储备液适量,稀释成8.264 mg·L<sup>-1</sup>内标溶液,4 °C保存。

**2.2.3 血浆样品的预处理** 取大鼠血浆50 μL,加入1 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾溶液30 μL,涡旋30 s;依次加入甲醇20 μL和内标溶液10 μL;涡旋30 s;加入甲醇-乙腈(1:1)100 μL,涡旋5 min;离心(10 min, 13 000 r·min<sup>-1</sup>,离心半径7 cm,下同),取上清液进样检测。在空白血浆中分别加入不同质量浓度的黄芩苷和黄芩素的对照品溶液各10 μL,按照血浆样品处理方法处理,得血浆质量控制(QC)样品。

**2.2.4 专属性考察** 分别进样空白血浆、空白血浆+10.27 mg·L<sup>-1</sup>黄芩苷对照品溶液+10.6 mg·L<sup>-1</sup>黄芩素对照品溶液+内标溶液(QC样品)及给药后2 h

血浆样品+内标溶液,按2.2.3项下方法处理,按2.2.1项下条件测定,结果发现血浆中的其他成分不会对目标成分及内标的测定产生干扰。见图2。



A. 空白血浆;B. QC样品;C. 供试品;1. 黄芩苷;2. 染料木素;3. 黄芩素

图2 灌胃给予黄芩苷镁后2 h大鼠血浆样品的HPLC  
Fig. 2 HPLC chromatograms of 2 h plasma samples of rats after intragastric administration of baicalin magnesium

**2.2.5 标准曲线和定量下限** 精密移取空白血浆50  $\mu\text{L}$ ,加入1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液30  $\mu\text{L}$ ,涡旋30 s;依次加入系列黄芩苷、黄芩素工作液各10  $\mu\text{L}$ 和内标溶液10  $\mu\text{L}$ ;其余按2.2.3项下方法操作,以分析物质量浓度为横坐标,分析物与内标的峰面积比值为纵坐标,采用加权最小二乘法( $W=1/X^2$ )计算得黄芩苷标准曲线 $Y=0.765\ 5X-0.053$ ( $R^2=0.998\ 2$ ),线性范围0.205~8.216  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,最低定量限(LLOQ)0.205  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。黄芩素标准曲线 $Y=0.922\ 4X-0.047$ ( $R^2=0.998\ 7$ ),线性范围0.212~8.480  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,LLOQ为0.212  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**2.2.6 精密度和准确度** 移取空白血浆50  $\mu\text{L}$ ,制备低、中、高质量浓度(黄芩苷质量浓度为0.411, 2.054, 8.216  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,黄芩素质量浓度为0.424, 2.12, 8.48  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )的血浆QC样品,每个质量浓度平行制备6份,重复测定6次,连续测定3 d,以相对标准差(RSD)表示准确度,以相对误差(RE)表示精确度。计算黄芩苷日内精密密度RSD分别为2.1%, 1.2%和1.5%;RE分别为4.7%, -0.4%和-0.4%。日间精密密度RSD分别为0.8%, 1.1%和0.0%;RE分别为5.0%, -0.9%和-1.0%。黄芩素的日内精密密度RSD分别为1.7%, 1.1%和2.2%;RE分别为-8.7%, -7.1%和-4.7%。日间精密密度RSD分别为0.4%, 0.9%和2.3%;RE分别为-8.6%, -7.4%和-5.3%。

**2.2.7 提取回收率** 精密移取空白血浆50  $\mu\text{L}$ ,制备低、中、高质量浓度的血浆QC样品,每个质量浓

度平行制备6份,按2.2.3项下方法处理,按2.2.1项下条件测定,记为样品A;按2.2.3项下方法处理空白血浆,分别加入低、中、高质量浓度的黄芩苷和黄芩素对照品溶液,涡旋60 s,离心,取上清进样,记为样品B。A与B的峰面积之比即为分析物的提取回收率。结果黄芩苷提取回收率分别为(71.97 $\pm$ 2.09)%, (89.59 $\pm$ 2.73)%和(92.15 $\pm$ 7.81)%;RSD分别为2.9%, 3.1%和8.5%。黄芩素提取回收率分别为(79.68 $\pm$ 3.25)%, (86.31 $\pm$ 1.69)%和(83.30 $\pm$ 3.85)%;RSD分别为4.1%, 2.0%和4.6%。

**2.2.8 稳定性** 将制备的中质量浓度血浆QC样品在-80  $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融3次,-80  $^{\circ}\text{C}$ 存放7 d及血浆QC样品经预处理后在进样器中放置12 h和24 h,按2.2.1项下条件测定,计算黄芩苷和黄芩素浓度的RSD均 $<3.0\%$ ,RE处于 $\pm 8.0\%$ ,符合生物样品测定要求。

**2.2.9 药代动力学试验** 将12只大鼠按随机数字表法分为正常组和模型组,每组6只。模型组按剂量1  $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射50%  $\text{CCl}_4$ 的橄榄油溶液造模,正常组注射相同体积的橄榄油溶液。造模20 h后灌胃给予黄芩苷镁水溶液(287.31  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),所有大鼠在给药前12 h,禁食不禁水。每只大鼠给药后0.083, 0.166, 0.333, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 h从眼内眦静脉取血0.3 mL,置于经1%肝素钠浸润处理过的离心管中,离心,取上清存放于-80  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,待测。测定前取出血浆样品,按2.2.3项下方法处理,按2.2.1项下色谱条件测定,绘制药-时曲线,见图3。使用DAS 3.0软件计算药代动力学参数,见表1。使用SPSS 23.0软件对2组大鼠的药代动力学参数进行统计学分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,以独立样本t检验对黄芩苷镁在正常组和模型组的药代动力学差异进行比较,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

在2组大鼠的血浆中几乎检测不到黄芩素。由图3可知,正常组和模型组黄芩苷镁的药-时曲线均呈双峰,提示黄芩苷镁在急性肝损伤大鼠体内可能存在肝肠循环;急性肝损伤能够减小黄芩苷镁的达峰时间( $t_{\text{max}}$ ),提高药物的吸收速度。由表1可知,模型组大鼠血浆中黄芩苷镁的药峰浓度( $C_{\text{max}}$ )是正常组大鼠的0.58倍;药时曲线下面积( $\text{AUC}_{0-t}$ )约为正常组的0.5倍,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );表观分布容积( $V_d$ )是正常组的2.3倍,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。结果表明在急性肝损伤状态下,黄芩苷镁在大鼠体内的吸收程度减小,分布更加广泛。

### 2.3 正常和肝损伤模型大鼠的组织分布研究

**2.3.1 色谱条件** 流动相0.1%磷酸水溶液-甲醇

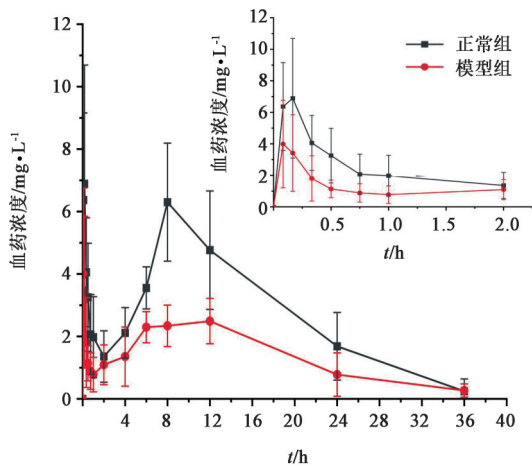


图3 正常组和模型组中黄芩苷镁的血药浓度-时间曲线( $\bar{x}\pm s, n=6$ )  
Fig. 3 Concentration-time curves of baicalin magnesium in normal and model rats ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

表1 正常组和模型组中黄芩苷镁的药动学参数( $\bar{x}\pm s, n=6$ )  
Table 1 Pharmacokinetic parameters of baicalin magnesium in normal and model rats ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

参数	正常组	模型组
$AUC_{0-12h}/mg\cdot L^{-1}\cdot h$	96.567±34.475	48.820±12.915 <sup>1)</sup>
$AUC_{0-\infty}/mg\cdot L^{-1}\cdot h$	99.476±33.09	52.218±16.457 <sup>1)</sup>
$MRT_{0-12h}/h$	12.437±1.326	12.198±2.849
$MRT_{0-\infty}/h$	13.739±3.369	14.162±4.205
$t_{1/2}/h$	5.570±3.765	7.373±2.796
$t_{max}/h$	0.167	0.083
$V_d/L\cdot kg^{-1}$	25.925±19.054	60.255±23.692 <sup>1)</sup>
$CL/L\cdot h^{-1}\cdot kg^{-1}$	3.139±0.927	5.894±1.547 <sup>2)</sup>
$C_{max}/mg\cdot L^{-1}$	6.890±3.798	3.983±2.770

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

(45:55),其他条件同2.2.1项。

2.3.2 溶液的配制 同2.2.2项。

2.3.3 组织样品的预处理 取组织样品肝、肺、肾、胃、脑、小肠各250 mg,加入甲醇20  $\mu$ L和1 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾溶液50  $\mu$ L,涡旋30 s;加甲醇500  $\mu$ L,涡旋60 s,使用高通量组织研磨器匀浆,匀浆3次(70 Hz,30 s);匀浆液涡旋5 min,离心,取上清液200  $\mu$ L,加8.264 mg·L<sup>-1</sup>内标溶液10  $\mu$ L,涡旋30 s;加入乙酸乙酯500  $\mu$ L,涡旋30 s,离心,取上清液600  $\mu$ L,于40 °C水浴条件下氮气吹干;残留物用流动相100  $\mu$ L复溶,涡旋60 s,离心,取上清液按2.3.1项下色谱条件检测。在各空白组织中分别加入不同质量浓度黄芩苷和黄芩素的对照品溶液10  $\mu$ L,按照组织样品处理方法处理,得各组织QC样品。

2.3.4 专属性考察 按2.3.1项下色谱条件分别进样空白组织、空白组织+51.35 mg·L<sup>-1</sup>黄芩苷对照品

溶液+53 mg·L<sup>-1</sup>黄芩素对照品溶液+内标溶液,给药后20 min(肝、肺、肾、脑、小肠)和2 h(胃)加入内标溶液的各组织生物样品,按2.3.3项下方法处理,按2.3.1项下色谱条件测定,结果发现各组织中的其他成分不会对目标成分及内标的测定产生干扰。见增强出版附加材料。

2.3.5 标准曲线和定量下限 精密移取各空白组织匀浆上清液200  $\mu$ L,依次加入系列黄芩苷、黄芩素工作液各10  $\mu$ L和内标溶液10  $\mu$ L;其余按2.3.3项下方法操作,以分析物质量浓度为横坐标,分析物与内标的峰面积比值为纵坐标,采用加权最小二乘法( $W=1/X^2$ )计算得到黄芩苷和黄芩素的标准曲线,见表2和表3。

表2 黄芩苷在各组织中含量测定的线性关系考察

Table 2 Linear relationship of baicalin in rat tissues

组织	回归方程	$R^2$	线性范围/ $\mu g\cdot g^{-1}$	LLOQ/ $\mu g\cdot g^{-1}$
肝	$Y=0.5603X+0.055$	0.9947	0.164~8.216	0.164
肺	$Y=0.5727X-0.022$	0.9959	0.164~8.216	0.164
肾	$Y=0.5246X+0.050$	0.9960	0.411~16.432	0.411
胃	$Y=0.5674X+0.085$	0.9952	0.164~16.432	0.164
脑	$Y=0.6801X+0.047$	0.9946	0.164~8.216	0.164
小肠	$Y=0.5344X+0.049$	0.9926	0.164~8.216	0.164

表3 黄芩素在各组织中含量测定的线性关系考察

Table 3 Linear relationship of baicalein in rat tissues

组织	回归方程	$R^2$	线性范围/ $\mu g\cdot g^{-1}$	LLOQ/ $\mu g\cdot g^{-1}$
肝	$Y=0.8013X+0.038$	0.9978	0.170~8.216	0.170
肺	$Y=0.8683X-0.040$	0.9968	0.170~8.216	0.170
肾	$Y=0.7143X-0.087$	0.9959	0.424~16.960	0.424
胃	$Y=0.7768X+0.002$	0.9969	0.170~16.960	0.170
脑	$Y=0.9415X-0.023$	0.9985	0.170~8.216	0.170
小肠	$Y=0.7705X+0.030$	0.9950	0.170~8.216	0.170

2.3.6 精密度和准确度 精密移取各空白组织匀浆上清液200  $\mu$ L,制备低、中、高质量分数的组织QC样品( $n=6$ ),重复测定6次,连续测定3 d,计算日内、日间的精密度和准确度,结果黄芩苷的RSD处于0.2%~5.9%,RE处于-2.5%~7.7%;黄芩素的RSD处于0.2%~8.3%,RE处于-5.0%~5.4%;具体数据见增强出版附加材料。

2.3.7 提取回收率 精密移取各空白组织匀浆上清液200  $\mu$ L,制备低、中、高质量分数的组织QC样品( $n=6$ ),按2.3.3项下方法处理组织QC样品,按

**2.3.1** 项下条件测定,记为样品A;按**2.3.3**项下组织样品预处理方法操作,加入低、中、高质量分数的黄芩苷和黄芩素对照品溶液,涡旋30 s,离心,取上清液600  $\mu\text{L}$ ,于40  $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下氮气吹干;残留物用流动相100  $\mu\text{L}$ 复溶,涡旋60 s,离心,取上清进样,记为样品B。A与B的峰面积之比即为分析物的提取回收率,结果黄芩苷提取回收率处于61%~80%,RSD均<7.5%;黄芩素提取回收率处于61%~75%,RSD均<7.5%;具体数据见增强出版附加材料。

**2.3.8** 稀释可靠性 精密移取胃和小肠的空白组织匀浆上清液200  $\mu\text{L}$ ,各加入5倍定量上限质量浓度的黄芩苷和黄芩素对照品溶液(胃组织中黄芩苷和黄芩素质量浓度分别为2.105  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和2.135  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,小肠中黄芩苷和黄芩素质量浓度分别为1.052 5, 1.067 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),使用甲醇将胃和小肠的组织样品分别稀释10倍和100倍,每个稀释因子平行制备6份,按**2.3.3**项下组织样品预处理方法操作,按**2.3.1**项下色谱条件测定,结果表明稀释后胃和小肠组织中黄芩苷和黄芩素浓度日内和日间的RSD均<6.0%,RE均处于 $\pm 6.0\%$ ,符合生物样品测定要求。

**2.3.9** 稳定性 将制备的中质量分数组织QC样品在-80  $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融3次,-80  $^{\circ}\text{C}$ 存放7 d及各组织QC样品经预处理后在自动进样器中放置12 h和24 h,

按**2.3.1**项下色谱条件测定,结果表明各组织中黄芩苷和黄芩素浓度的RSD均<5.0%,RE均在 $\pm 8.0\%$ ,符合生物样品测定要求。

**2.4** 组织分布试验 将72只大鼠按随机数字表法分成12组,其中1~6组为正常组,7~12组为急性肝损伤模型组,每个取材时间点为1组,每组6只。模型组按剂量1  $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射50%  $\text{CCl}_4$ 的橄榄油溶液造模,正常组注射相同体积的橄榄油溶液。造模20 h后灌胃黄芩苷镁水溶液(287.31  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),所有大鼠在给药前12 h禁食不禁水。在给药后0.333, 2, 4, 6, 8, 12 h腹腔注射4%水合氯醛麻醉(给药体积10  $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),立即解剖,腹主动脉取血,摘取每只大鼠的肝、肺、肾、胃、脑、小肠,使用生理盐水冲洗组织表面,滤纸吸干表面液体,存放于-80  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,待测。测定前取出组织,自然解冻,按**2.3.3**项下方法处理组织样品,按**2.3.1**项下色谱条件测定。其中,正常组0.333, 2 h的胃组织样品稀释10倍;0.333, 2 h的小肠组织样品稀释100倍;4, 6 h的小肠组织样品稀释50倍。模型组0.333, 2 h的胃组织样品稀释100倍;4, 6, 8 h的胃组织样品稀释10倍;0.333, 2 h的小肠组织样品稀释100倍;4, 6 h的小肠组织样品稀释50倍;8, 12 h的小肠组织样品稀释了10倍。见表4~表7。

表4 黄芩苷镁在正常大鼠组织中不同时间点的药物浓度( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 4 Concentrations of baicalin magnesium at different time points in tissues of normal rats ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组织	质量分数/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$					
	0.333 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
肝	0.69 $\pm$ 0.29	0.99 $\pm$ 0.57	1.88 $\pm$ 0.60	1.12 $\pm$ 0.93	0.91 $\pm$ 0.39	0.24 $\pm$ 0.20
肺	0.75 $\pm$ 0.45	1.76 $\pm$ 1.22	1.07 $\pm$ 0.36	1.28 $\pm$ 0.31	1.26 $\pm$ 0.27	0.48 $\pm$ 0.14
肾	3.65 $\pm$ 1.18	3.59 $\pm$ 1.93	10.65 $\pm$ 9.05	9.56 $\pm$ 3.58	11.32 $\pm$ 3.06	4.82 $\pm$ 2.15
胃	38.03 $\pm$ 33.77	19.02 $\pm$ 9.73	5.67 $\pm$ 3.07	2.17 $\pm$ 0.80	1.98 $\pm$ 1.46	2.24 $\pm$ 1.89
脑	0.44 $\pm$ 0.43	0.26 $\pm$ 0.11	0.25 $\pm$ 0.14	0.14 $\pm$ 0.05	0.10 $\pm$ 0.05	0.04 $\pm$ 0.04
小肠	429.75 $\pm$ 417.68	554.09 $\pm$ 505.34	43.56 $\pm$ 41.73	15.75 $\pm$ 10.45	5.32 $\pm$ 3.18	3.13 $\pm$ 2.45

表5 黄芩苷镁在模型大鼠组织中不同时间点的药物浓度( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 5 Concentrations of baicalin magnesium at different time points in tissues of model rats ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组织	质量分数/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$					
	0.333 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
肝	2.07 $\pm$ 1.93	1.85 $\pm$ 1.58	2.15 $\pm$ 1.15	3.04 $\pm$ 1.90	1.46 $\pm$ 0.61	1.81 $\pm$ 0.80
肺	4.91 $\pm$ 2.70	1.93 $\pm$ 0.63	1.27 $\pm$ 0.41	1.63 $\pm$ 0.86	1.13 $\pm$ 0.43	1.00 $\pm$ 0.37
肾	3.85 $\pm$ 1.70	8.38 $\pm$ 2.52	14.46 $\pm$ 4.99	16.80 $\pm$ 4.99	6.55 $\pm$ 3.69	4.04 $\pm$ 1.50
胃	61.00 $\pm$ 32.59	36.32 $\pm$ 25.64	6.37 $\pm$ 3.95	15.62 $\pm$ 10.93	3.34 $\pm$ 1.29	5.36 $\pm$ 3.69
脑	0.85 $\pm$ 0.77	0.55 $\pm$ 0.32	0.32 $\pm$ 0.10	0.29 $\pm$ 0.23	0.41 $\pm$ 0.40	0.12 $\pm$ 0.06
小肠	365.07 $\pm$ 273.00	735.09 $\pm$ 430.66	240.26 $\pm$ 174.60	69.05 $\pm$ 59.76	31.03 $\pm$ 25.88	6.16 $\pm$ 4.99

表6 黄芩素在正常大鼠组织中不同时间点的药物浓度( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 6 Concentrations of baicalin at different time points in tissues of normal rats ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组织	质量分数/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$					
	0.333 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
肝	0.34±0.24	0.55±0.17	1.06±0.45	1.55±0.60	0.89±0.55	0.17±0.07
肺	0.26±0.12	0.56±0.34	0.50±0.24	0.69±0.23	0.68±0.34	0.19±0.06
肾	1.83±0.95	1.78±1.25	6.26±5.34	9.25±6.55	6.66±4.62	1.02±0.52
胃	138.94±50.04	63.32±10.94	32.00±18.32	4.31±3.57	1.53±0.88	0.65±0.44
小肠	156.22±95.91	112.99±78.23	53.67±48.01	18.14±9.84	3.08±1.11	1.77±1.06

表7 黄芩素在模型大鼠组织中不同时间点的药物浓度( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 7 Concentrations of baicalin at different time points in tissues of model rats ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组织	质量分数/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$					
	0.333 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
肝	1.36±1.02	1.07±0.80	1.61±1.09	0.75±0.46	0.67±0.43	0.89±0.58
肺	3.18±2.39	1.13±0.78	0.67±0.27	0.78±0.64	0.75±0.55	0.46±0.19
肾	0.97±0.31	2.07±0.87	5.47±2.66	4.71±2.77	6.94±3.33	5.70±1.97
胃	219.68±69.83	163.51±75.36	52.21±44.93	82.64±51.54	22.60±11.82	12.29±11.86
小肠	201.09±166.37	240.68±99.42	290.37±125.53	89.49±79.89	70.29±64.53	31.38±26.37

由表4~表7可知,与正常组相比,黄芩苷镁在急性肝损伤模型组大鼠的肝、胃、脑中各时间点的质量分数均高于正常组,而在肺8 h,肾8, 12 h,小肠0.333 h的组织样品中黄芩苷镁的质量分数低于正常组;黄芩素在模型组大鼠的肺、胃、小肠中各时间点的质量分数均高于正常组,而在肝6, 8 h,肾0.333, 4, 6 h的组织样品中黄芩素的质量分数低于正常组,在脑中则几乎检测不到黄芩素。表明在正常和急性肝损伤状态下,黄芩苷镁和黄芩素在不同时间点肝、肺、肾、胃和小肠中的质量分数存在较大差异,分布程度也存在较大差异。提示肝损伤会影响黄芩苷镁和黄芩素在大鼠体内的组织分布,且二者在肝、肺、肾、胃、小肠组织中存在生物转化。

### 3 讨论

本研究旨在为黄芩苷镁口服给药系统的研究提供实验数据和理论基础,故采用灌胃给药方式给予正常和急性肝损伤大鼠黄芩苷镁。由于口服黄芩苷镁保肝作用的研究尚在摸索阶段,因此黄芩苷镁的给药剂量参考口服黄芩苷发挥保肝作用的文献剂量。在参考文献[16]中,灌胃黄芩苷在小鼠中的剂量为 $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,根据体表面积公式换算成大鼠灌胃黄芩苷的剂量,再换算成等摩尔黄芩苷镁的剂量,最终确定本实验中黄芩苷镁的给药剂量为 $287.31\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

在大鼠血浆样品中几乎未检测到黄芩素,仅在

黄芩苷镁血药浓度为 $C_{\text{max}}$ 左右的样品中,检测到微量的黄芩素。相关文献研究也表明,口服黄芩素吸收入血后,血浆中黄芩素的浓度极低,其主要以代谢物黄芩苷的形式而存在<sup>[17-18]</sup>。药动学结果显示,在急性肝损伤状态下大鼠血浆中黄芩苷镁的 $\text{AUC}_{0-t}$ 明显减少, $V_d$ 明显增加,推测可能是由于 $\text{CCl}_4$ 致大鼠肝损伤后肝细胞受到破坏,肝脏合成蛋白的能力下降,导致大鼠血浆中蛋白总量变少<sup>[19]</sup>,血浆中结合药物数量减少,游离药物数量增加<sup>[20-21]</sup>,同时肝损伤也能引起组织细胞膜的通透性增加,使药物更容易进入组织,进而导致 $\text{AUC}_{0-t}$ 减少和 $V_d$ 增加。组织分布结果表明,在急性肝损伤状态下,各组织中黄芩苷镁和黄芩素的浓度较高,进一步证实由于 $\text{CCl}_4$ 毒性代谢产物的影响,各组织膜的通透性增加<sup>[22-23]</sup>,药物比正常状态下更容易进入组织。与其他组织不同的是,在脑组织中几乎检测不到黄芩素,推测可能是不同组织器官中由于酶的种类及其他因素导致生物转化结果有所不同<sup>[24]</sup>。

本课题组前期将黄芩苷镁(质量分数93.1%)和黄芩苷对照品在此色谱条件下进样检测,结果发现黄芩苷镁和黄芩苷两者色谱峰保留时间一致。但由于体内酶体系复杂,灌胃黄芩苷镁水溶液后,黄芩苷镁在体内是以原型存在还是以黄芩苷的形式存在目前尚不明确,探究黄芩苷镁在体内的具体存在形式将是本课题组下一步的研究方向。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 马玲玲,孙燕. 中药黄芩药理作用的研究进展[J]. 沈阳医学院学报,2016,18(2):115-117.
- [2] 李海燕,李夏,金向群,等. 黄芩苷对大鼠慢性酒精性肝损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(6):58-60.
- [3] PARK S W, LEE C H, KIM Y S, et al. Protective effect of baicalin against carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice[J]. J Pharmacol Sci, 2008, 106(1):136-143.
- [4] 金鹏,许海舰,徐宝欣,等. 黄芩苷研究现状及其镁盐研究前景[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(20):228-234.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:445-1901.
- [6] 龙宇,向燕,谭裕君,等. 黄芩苷药理作用及新剂型的研究进展[J]. 中草药,2019,50(24):6142-6148.
- [7] 李俊杰,文学平,徐凌云. 黄芩苷新剂型及其药理学研究进展[J]. 中国新药杂志,2017,26(17):2046-2051.
- [8] 刘翠哲,王志轩,苗策禹,等. 一种黄芩苷镁化合物及其制备方法与它的用途:中国,CN105732753A[P]. 2016-07-06.
- [9] LIU C Z, WANG Z X, MIAO C Y, et al. Baicalin magnesium compound and its preparation method and application:USA,US10196417B2[P]. 2019-02-05.
- [10] 金鹏,李景,刘翠哲. 注射用黄芩苷镁盐冻干粉在大鼠体内的药代动力学及组织分布[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(10):102-108.
- [11] 白红红,金鹏,李景,等. 注射用黄芩苷镁盐冻干粉配伍稳定性及其保肝作用研究[J]. 中成药,2021,43(6):1636-1641.
- [12] 许海舰,刘一鑫,刘喜纲,等. 黄芩苷镁盐和黄芩苷的肠吸收动力学和药代动力学比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(4):78-83.
- [13] 姚文丽,杜鹏,刘学,等. 急性肝损伤对注射用清开灵(冻干)体内药动学影响的研究[J]. 时珍国医国药,2019,30(1):65-69.
- [14] HUO X K, WANG B, ZHENG L, et al. Comparative pharmacokinetic study of baicalin and its metabolites after oral administration of baicalin and Chaiqin Qingning capsule in normal and febrile rats [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017, 1059:14-20.
- [15] HE M Y, DENG Y X, SHI Q Z, et al. Comparative pharmacokinetic investigation on baicalin and wogonoside in type 2 diabetic and normal rats after oral administration of traditional Chinese medicine Huanglian Jiedu decoction [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 155(1):334-342.
- [16] DAI J Y, LIANG K, ZHAO S, et al. Chemoproteomics reveals baicalin activates hepatic CPT1 to ameliorate diet-induced obesity and hepatic steatosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(26):E5896-E5905.
- [17] 王文玉,戴建业,孙淑军,等. 黄芩素药代动力学研究进展[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2011,13(6):1018-1021.
- [18] 刘兆明,马越鸣,王天明,等. 黄芩苷与黄芩素在离体大鼠肝、肾、小肠及膀胱中代谢的相互转化[J]. 药学学报,2008,43(6):664-668.
- [19] MAHESHWARI D T, KUMAR M S Y, VERMA S K, et al. Antioxidant and hepatoprotective activities of phenolic rich fraction of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves[J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(9):2422-2428.
- [20] 章海鑫,胡鲲,阮记明,等. 异育银鲫体内盐酸双氟沙星血浆蛋白结合率的变化与其药代动力学研究[J]. 水生生物学报,2013,37(1):62-69.
- [21] 郭宾,李川. 药物与血浆蛋白结合的药理学基础及其研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学,2005,10(3):241-253.
- [22] LI X W, ZHU R, LI B, et al. Mechanism underlying carbon tetrachloride-inhibited protein synthesis in liver [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(31):3950-3956.
- [23] ZHANG C, WEI Q, JIANG T, et al. Liver cancer-related gene CYP2E1 expression in HBV transgenic mice with acute liver injury[J]. Tumour Biol, 2014, 35(4):3671-3677.
- [24] HOU Y C, LIN S P, TSAI S Y, et al. Flavonoid pharmacokinetics and tissue distribution after repeated dosing of the roots of *Scutellaria baicalensis* in rats[J]. Planta Med, 2011, 77(5):455-460.

[责任编辑 刘德文]