

· 药物代谢 ·

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

刘廷, 狄留庆*, 李娟, 康安, 李俊松, 赵晓莉, 单进军

(南京中医药大学药学院, 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 南京 210023)

[摘要] 目的:建立同时测定大鼠灌服双黄连制剂后血浆中酚酸类(新绿原酸、绿原酸及隐绿原酸)与黄酮类(黄芩苷、千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素及千层纸素 A)成分的超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS),并研究其药代动力学。方法:血浆样品采用乙酸乙酯-正丁醇(1:1)萃取,流动相0.4%甲酸水溶液-[乙腈-甲醇(4:1)混合液]梯度洗脱,流速0.4 mL·min⁻¹,采用电喷雾离子化,多反应监测离子扫描模式,选用响应较高的正离子模式。结果:建立的同时测定血浆中9种成分的UPLC-MS/MS线性良好($R^2 > 0.992$),精密度RSD均<14.2%,准确度85.49%~114.76%,复方中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、黄芩苷、千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖苷、汉黄芩苷、黄芩素的药时曲线下面积AUC_{0-t}与AUC_{0-∞}与单味药提取物相比显著增加,而酚酸和黄酮类成分的消除速率较单味药提取液缓慢。结论:建立的UPLC-MS/MS特异、快速、准确及灵敏,可用于双黄连制剂中9种主要活性成分在大鼠体内的药代动力学研究。

[关键词] 双黄连制剂; 酚酸类; 黄酮类; 药代动力学; 替硝唑

[中图分类号] R969.1;R945;R284.1;R944.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)18-0082-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016180082

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160727.1602.006.html>

[网络出版时间] 2016-07-27 16:02

Determination and Pharmacokinetic Analysis of Phenolic Acids and Flavonoids After Oral Administration of Shuanghuanglian Preparation by UPLC-MS/MS

LIU Ting, DI Liu-qing*, LI Juan, KANG An, LI Jun-song, ZHAO Xiao-li, SHAN Jin-jun

(Jiangsu Provincial Engineering Technology Research Center of High Efficient Drug Delivery System of Traditional Chinese Medicine, College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** A rapid and sensitive ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method (UPLC-MS/MS) was developed and validated for simultaneously determination of phenolic acids and flavonoids in rat plasma after oral administration of Shuanghuanglian preparation. **Method:** Plasma samples were pretreated by *n*-butanol-ethyl acetate (1:1). The separation was performed on an Waters Acquity HSS T3 C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) and the flow rate was set at 0.4 mL · min⁻¹ with mobile phase of acetonitrile-methanol (4:1) -0.4% formic acid for gradient elution. The detection was performed on a triple quadrupole tandem mass spectrometer by multiple reaction monitoring (MRM) via electrospray ionization (ESI) source with positive mode. **Result:** All calibration curves had good linearity ($R^2 > 0.992$). RSDs of precision

[收稿日期] 20151008(004)

[基金项目] 江苏省“333 高层次人才培养工程”项目(BRA2013201);江苏高校优势学科建设工程项目(ysxk-2010)

[第一作者] 刘廷,在读硕士,从事药物新剂型与新技术研究,Tel:025-85811230,E-mail:liuting19900902@163.com

[通讯作者] *狄留庆,教授,博士生导师,从事中药学研究,Tel:025-85811230,E-mail:diliuqing928@163.com

and accuracy were all satisfied. After oral administration of Shuanghuanglian preparation, a remarkable increase in values of AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$ of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, baicalin, oroxylin A-7-O- β -D-glucuronide, wogonoside and baicalein was observed by compared with Lonicerae Japonicae Flos extract group or Scutellariae Radix extract group; but the elimination rate of phenolic acids and flavonoids in Shuanghuanglian preparation was slower than the single herb extract. **Conclusion:** The developed method is successfully applied to pharmacokinetic study of nine active ingredients in Shuanghuanglian preparation, this study can provide experimental evidence for elucidating rationality of compatibility of this preparation.

[**Key words**] Shuanghuanglian preparation; phenolic acids; flavonoids; pharmacokinetics; tinidazole

双黄连制剂由金银花、连翘、黄芩 3 味中药组成^[1], 功效清热解毒^[2,4], 临床主要用于治疗由上呼吸道感染引起的头痛、发热等症状。研究表明复方的药效优于单味药^[3,5], 且酚酸类和黄酮类成分为双黄连制剂中发挥清热解毒功效的主要药效物质^[6-11], 但酚酸类和黄酮类成分在复方中的吸收代谢行为异于单味药而使其更好地发挥药效的机制尚无定论。目前, 双黄连制剂中主要成分的药代动力学研究主要针对绿原酸和黄芩苷 2 个指标性成分^[5,12], 但单个成分的药代动力学行为并不足以代表全方。故本实验拟建立双黄连制剂中 9 个酚酸类和黄酮类成分的 UPLC-MS/MS, 比较其在双黄连制剂与相应单味药中的体内药代动力学行为差异, 为阐明该制剂的配伍合理性提供依据。

1 材料

Acquity 型超高效液相色谱-Xevo 型串联质谱联用仪(美国 Waters 公司), MicroCL 21R 型微量离心机(美国赛默飞世尔科技公司), Milli-Q Synthesis 108 型超纯水仪(美国密理博公司)。金银花、连翘和黄芩均购自南京益丰大药房, 经南京中医药大学陈建伟教授鉴定, 均符合《中国药典》2015 年版一部有关规定; 双黄连制剂(参照《中国药典》2015 年版“双黄连口服液”制剂处方及制备工艺自制, 以保障单味中药饮片与制剂投料用饮片质量的一致性), 黄芩苷、替硝唑对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为 110715-201318, 100336-200703), 绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、汉黄芩苷、千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖苷、黄芩素、汉黄芩素及千层纸素 A 对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司, 批号分别为 L-007-130130, X-014-130126, Y-067-140116, H-019-140729, Q-046-140111, H-018-140729, H-029-140729, Q-020-140731, 纯度均 > 98%), 水为重蒸水, 乙腈、甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

雄性 SD 大鼠 18 只, 8 周龄, 体重 220 ~ 250 g, 由南京中医药大学实验动物中心提供, 合格证号

SCXK(浙)2014-0001。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[13] Waters Acquity HSS T3 C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μ m), 流动相 0.4% 甲酸水溶液(A)-[乙腈-甲醇(4:1)混合液](B) 梯度洗脱(0 ~ 0.5 min, 10% ~ 11% B; 0.5 ~ 0.75 min, 11% ~ 13% B; 0.75 ~ 1.5 min, 13% ~ 15% B; 1.5 ~ 2 min, 15% ~ 10% B; 2 ~ 3 min, 10% ~ 30% B; 3 ~ 6.2 min, 30% ~ 70% B; 6.2 ~ 6.5 min, 70% ~ 10% B; 6.5 ~ 7 min, 10% B), 流速 0.4 mL·min⁻¹, 进样量 5 μ L, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 自动进样器温度 10 $^{\circ}$ C。

2.2 质谱条件 离子化方式为电喷雾离子化, 正离子模式, 多反应监测离子扫描模式测定。主要质谱参数为毛细管电压 3.3 kV, 源温度 150 $^{\circ}$ C, 脱溶剂温度 400 $^{\circ}$ C, 锥孔气体流速 50 L·h⁻¹, 脱溶剂气体流速 800 L·h⁻¹。9 种待测物与内标检测离子对的 m/z 分别为新绿原酸、绿原酸及隐绿原酸(354.8 ~ 162.9), 汉黄芩素及千层纸素 A(284.8 ~ 270.0), 汉黄芩苷及千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖苷(460.8 ~ 285.0), 黄芩苷(446.8 ~ 271.0), 黄芩素(247.8 ~ 120.8)及替硝唑(248.0 ~ 121.0)。

2.3 溶液的配制

2.3.1 药液 连翘、金银花分别加水浸泡 30 min, 加 10 倍量水煎煮 2 次, 每次 1.5 h, 合并煎液, 滤过, 滤液浓缩成相对密度 1.20 ~ 1.25(70 ~ 80 $^{\circ}$ C) 的清膏, 冷却至 40 $^{\circ}$ C, 缓慢加入乙醇使含醇量达 75%, 静置 12 h, 滤过, 上清液另存; 残渣加 75% 乙醇适量, 搅匀, 静置 12 h, 滤过, 合并上清液, 减压回收至无醇味, 得连翘提取液和金银花提取液。黄芩分别加 10, 8, 8 倍量水煎煮 3 次, 提取时间分别为 2, 1, 1 h, 其余步骤同金银花、连翘, 得黄芩提取液。金银花提取液中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸质量浓度分别为 2.725, 12.549, 3.474 g·L⁻¹; 黄芩提取液中黄芩苷、千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖苷、黄芩素、汉黄芩苷、千层纸素 A 及汉黄芩素质量浓度分别为

21.937, 26.497, 4.745, 4.077, 0.814, 1.220 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 连翘中未检测到上述成分。双黄连制剂系参照《中国药典》2015 年版双黄连口服液制剂项下要求, 取金银花、连翘、黄芩提取液按体积比 1:2:1 混合, 金银花和黄芩单提液加等体积溶媒。

2.3.2 混合对照品溶液 分别精密称取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、黄芩苷、千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素及千层纸素 A 对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 得质量浓度分别为 261, 201, 211, 219, 201, 108, 219, 123, 210 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液。分别移取适量对照品储备液至 10 mL 量瓶中, 加流动相 [乙腈-甲醇(4:1)]-0.4% 甲酸水溶液(1:9) 稀释至刻度, 逐步稀释得系列混合对照品溶液及质控溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.3.3 内标溶液 精密称取替硝唑对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 得 240 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液。取该储备液适量于 10 mL 量瓶中, 加流动相 [乙腈-甲醇(4:1)]-0.4% 甲酸水溶液(1:9) 稀释至刻度, 得质量浓度为 240 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的内标溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。

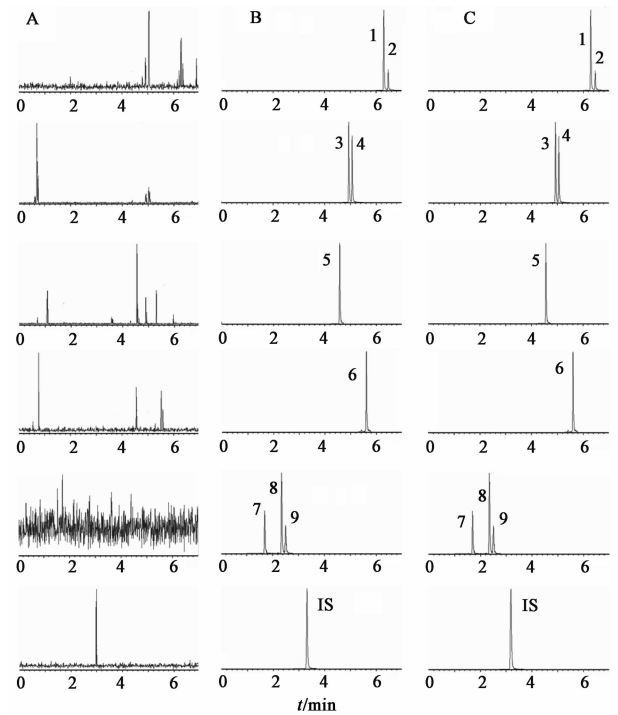
2.4 给药与样品采集 SD 大鼠随机分为金银花提取液组、黄芩提取液组与双黄连组(虽然连翘中苯乙醇苷类成分是活性成分, 但其生物利用度低, 体内测不到, 故未设置连翘提取液组), 每组 6 只, 给药前禁食 12 h, 自由饮水。按 13 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药^[12], 分别于给药后 0.083, 0.167, 0.333, 0.667, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 36 h 眼眶取血约 0.2 mL, 置于肝素化的离心管中, 离心(6 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 7 min), 上清置于另一离心管中, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.5 血浆样品处理 精密吸取血浆 50 μL , 加入内标溶液 10 μL 及 2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 20 μL , 涡旋 30 s 后加入乙酸乙酯-正丁醇(1:1) 混合液 1 mL, 涡旋 5 min, 离心(12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 取上清 800 μL 置于另一离心管中, 离心浓缩至干, 残渣加 [乙腈-甲醇(4:1)]-0.4% 甲酸水溶液(1:9) 100 μL 复溶, 涡旋 5 min, 离心(14 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 取上清液 5 μL 进样分析。

2.6 方法学考察

2.6.1 专属性试验 分别取空白血浆、空白血浆 + 9 种待测物及内标物、大鼠灌胃给药 10 min 后血浆样品, 按 2.5 项下方法处理后进样, 结果见图 1。说明建立的方法专属性强, 9 种待测物及内标在分析时间内均不存在内源性物质的干扰。

2.6.2 线性关系及定量下限 分别精密吸取不同



A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 9 种待测物及内标物; C. 大鼠灌服双黄连 10 min 后的血浆样品; 1. 汉黄芩素; 2. 千层纸素 A; 3. 汉黄芩苷; 4. 千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖苷; 5. 黄芩素; 6. 黄芩苷; 7. 新绿原酸; 8. 绿原酸; 9. 隐绿原酸; IS. 替硝唑

图 1 大鼠血浆中 9 种待测物及内标物的 HPLC

Fig. 1 Representative HPLC chromatograms of nine analytes and tinidazole in rat plasma

质量浓度的混合对照品溶液 10 μL 置于离心管中, 离心浓缩至干, 加入大鼠空白血浆 50 μL , 按 2.5 项下方法处理, 以血浆中各待测物质量浓度为横坐标, 以待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标, 得 9 种成分的线性范围、回归方程及相关系数, 见表 1。

2.6.3 精密密度与准确度 根据标准曲线范围选择低、中、高 3 个质量浓度(新绿原酸 2.5, 65, 520 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 绿原酸 4, 100, 800 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 隐绿原酸 2, 50, 420 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 黄芩苷 4.5, 550, 4 400 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖苷 4, 100, 800 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 汉黄芩苷 4.5, 110, 850 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 黄芩素 2, 54, 430 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 汉黄芩素 2.5, 62, 490 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 千层纸素 A 2.1, 55, 420 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 用空白血浆配制成相应质量浓度的血浆样品 ($n=6$), 按 2.5 项下方法处理后进样, 计算 9 种待测成分的日内及日间精密密度以 RSD 表示均 < 14.2%, 准确度在 85.49% ~ 114.76%, 均符合要求。

2.6.4 提取回收率 精密吸取 2.6.3 项下低、中、高质量浓度的混合对照品溶液 10 μL 置于离心管中, 离心浓缩至干, 加入大鼠空白血浆 50 μL ($n=6$), 按 2.5 项下方法处理。另取空白血浆 50 μL , 按

表 1 双黄连制剂中 9 个待测成分的线性回归方程和定量限

Table 1 Regression data and LLOQs of nine phenolic acids and flavonoids in Shuanghuanglian preparation

成分	线性范围 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	回归方程	R^2	最低定量限 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
新绿原酸	1.04 ~ 652.5	$Y = 0.0025X + 0.0242$	0.9927	1.04
绿原酸	1.61 ~ 1005	$Y = 0.0016X + 0.0282$	0.9924	1.61
隐绿原酸	0.84 ~ 527.5	$Y = 0.0010X + 0.0101$	0.9954	0.84
黄芩苷	1.75 ~ 5475.0	$Y = 0.0025X + 0.0730$	0.9971	1.75
千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖苷	1.61 ~ 1005.0	$Y = 0.0168X + 0.0106$	0.9954	1.61
汉黄芩苷	2.16 ~ 1080.0	$Y = 0.0088X + 0.9990$	0.9958	2.16
黄芩素	0.86 ~ 535.0	$Y = 0.0014X + 0.0030$	0.9992	0.86
汉黄芩素	0.98 ~ 615.0	$Y = 0.0048X + 0.0137$	0.9990	0.98
千层纸素 A	0.84 ~ 525.0	$Y = 0.0011X - 0.0024$	0.9960	0.84

2.5 项下方法处理后分别加入低、中、高质量浓度的混合对照品溶液 10 μL , 离心浓缩至干, 加入 [乙腈-甲醇 (4:1)]-0.4% 甲酸水溶液 (1:9) 100 μL 复溶, 离心后进样分析, 以空白血浆处理前与处理后的峰面积比值计算提取回收率在 52.71% ~ 108.76%。

2.6.5 基质效应 取空白血浆 50 μL , 按 2.5 项下方法处理, 离心浓缩至干后分别加入低、中、高 3 个质量浓度的混合对照品溶液 10 μL ($n = 6$), 离心浓缩至干, 加入 [乙腈-甲醇 (4:1)]-0.4% 甲酸水溶液 (1:9) 100 μL 复溶, 离心后进样分析。同时配制相同质量浓度的混合对照品溶液直接进样分析, 空白血浆中加入对照品所得峰面积与对照品溶液所得峰面积之比, 即为基质效应。结果 9 个待测成分的基质效应均在 87.16% ~ 111.74%。

2.6.6 稳定性 按 2.6.3 项下方法制备高、中、低 3 个质量浓度标准血浆样品 ($n = 6$), 处理好后测定 1 次, 放置于 10 $^{\circ}\text{C}$ 的样品盘中 24 h 后再测定 1 次, 考察 9 种成分在进样分析过程中的稳定性; 同样制备高、中、低 3 个质量浓度标准血浆样品, 考察反复冻融 3 次的稳定性 (-80 ~ 20 $^{\circ}\text{C}$)。结果 RSD 均 $\leq 15.0\%$, 表明 9 个待测成分在上述条件下稳定性良好。

2.7 血药浓度的测定 将不同时间点的血浆样品按 2.5 项下方法处理后, 按 2.1 和 2.2 项下方法进样分析, 测定 9 个待测成分的浓度, 绘制各成分的血药浓度-时间曲线, 见图 2。

2.8 药代动力学参数 采用 DAS 3.0 药动力学软件处理 3 组大鼠给药后不同时间点的血药浓度数据, 计算各成分的药代动力学参数, 见表 2, 3。

表 2 金银花提取液组与双黄连组中 3 个待测成分的药代动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Non-compartmental pharmacokinetic parameters of three ingredients in Lonicerae Japonicae Flos extract and Shuanghuanglian preparation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

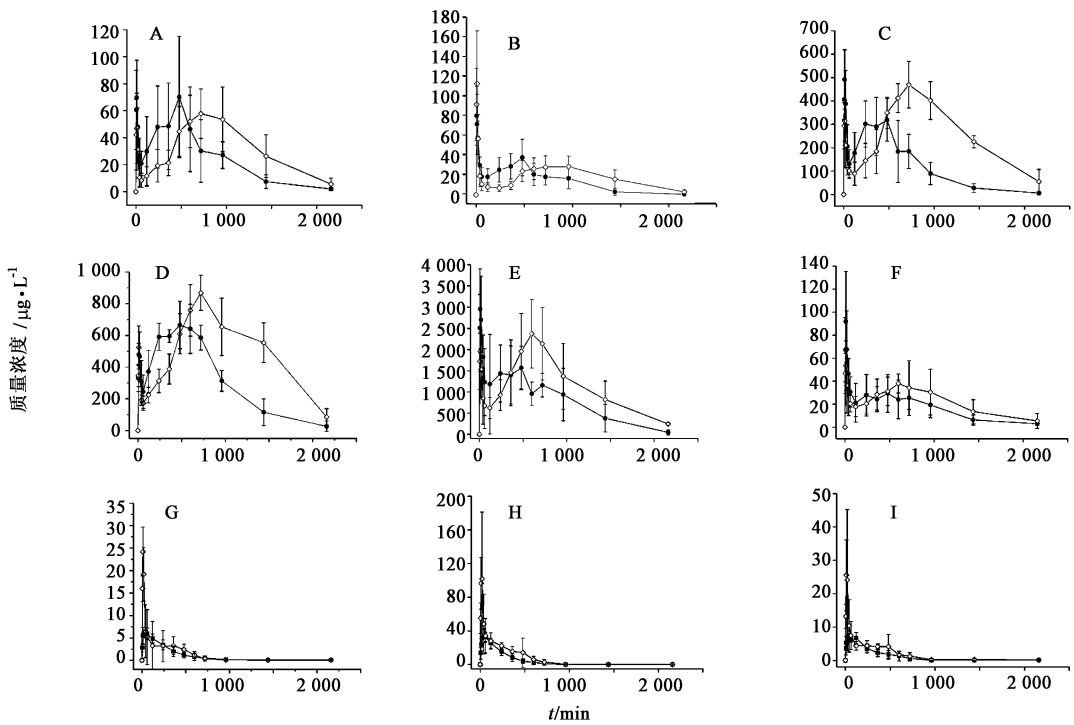
成分	组别	C_{\max} / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	T_{\max} /min	$t_{1/2}$ /h	AUC_{0-t} / $\text{mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$	$AUC_{0-\infty}$ / $\text{mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$	CL_z/F / $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$
新绿原酸	金银花提取液	7.11 ± 0.917	38.33 ± 20.41	6.71 ± 4.01	2.07 ± 0.39	2.08 ± 0.39	4.95 ± 0.92
	双黄连	$26.89 \pm 10.35^{2)}$	$12.50 \pm 6.12^{1)}$	4.09 ± 1.34	$2.81 \pm 1.25^{1)}$	$2.94 \pm 1.28^{1)}$	3.94 ± 1.59
绿原酸	金银花提取液	37.20 ± 9.25	40.00 ± 12.65	4.24 ± 2.74	8.93 ± 1.79	8.94 ± 1.79	1.15 ± 0.21
	双黄连	$122.46 \pm 66.73^{2)}$	$13.33 \pm 5.16^{2)}$	5.54 ± 3.56	$13.99 \pm 4.83^{1)}$	$14.01 \pm 4.82^{1)}$	$0.80 \pm 0.29^{1)}$
隐绿原酸	金银花提取液	8.10 ± 1.14	80.00 ± 43.82	9.05 ± 0.87	2.36 ± 0.60	2.36 ± 0.60	4.46 ± 1.17
	双黄连	$30.93 \pm 17.70^{1)}$	$13.33 \pm 5.16^{2)}$	7.11 ± 5.37	$3.69 \pm 1.27^{1)}$	$3.76 \pm 1.30^{1)}$	2.98 ± 1.20

注: 与金银花组提取液比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

本文建立了大鼠灌胃给药双黄连后同时测定酚酸类和黄酮类成分的 UPLC-MS/MS, 该方法提取回收率、精密度、准确度及稳定性均较好, 并成功用于双黄连口服液的大鼠药代动力学研究。本实验所测 9 种成分均选择响应较好的正离子模式进行测定,

且分子离子峰均为稳定的 $[M + H]^+$ 峰; 9 个成分中有 3 组同分异构体, 其测定离子对一致, 质谱无法区分, 因此利用 UPLC 进行分离, 有机相采用乙腈与甲醇 2 种溶剂混合, 水相中加入 0.4% 甲酸抑制峰拖尾, 使离子对之间实现较好的分离; 酚酸类成分易溶于乙酸乙酯而苷类成分易溶于正丁醇, 因此本文萃



■. 金银花提取物; ●. 黄芩提取物; ◇. 双黄连; A. 汉黄芩素; B. 千层纸素 A; C. 汉黄芩苷; D. 千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖苷; E. 黄芩苷; F. 黄芩素; G. 新绿原酸; H. 绿原酸; I. 隐绿原酸

图 2 大鼠灌胃给药后 9 个待测成分的药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves of nine phenolic acids and flavonoids in Shuanghuanglian preparation ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表 3 黄芩提取液组与双黄连组中 6 个待测成分的药代动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Non-compartmental pharmacokinetic parameters of six ingredients in Scutellariae Radix extract and Shuanghuanglian preparation ($\bar{x} \pm s, n=6$)

成分	组别	C_{max1} /mg·L ⁻¹	T_{max1} /min	C_{max2} /mg·L ⁻¹	T_{max2} /h
黄芩苷	黄芩提取液	3.29 ± 0.79	13.33 ± 7.53	2.08 ± 0.82	9.00 ± 2.25
	双黄连	2.09 ± 0.52 ¹⁾	11.67 ± 6.83	2.58 ± 0.87	10.00 ± 1.79
千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖苷	黄芩提取液	0.44 ± 0.17	13.33 ± 7.53	0.80 ± 0.42	8.33 ± 3.45
	双黄连	0.40 ± 0.23	14.17 ± 6.65	0.93 ± 0.30	12.67 ± 5.75
汉黄芩苷	黄芩提取液	0.55 ± 0.30	11.67 ± 6.83	0.40 ± 0.24	8.33 ± 5.72
	双黄连	0.27 ± 0.10 ²⁾	23.49 ± 13.84	0.53 ± 0.25	15.00 ± 7.13
黄芩素	黄芩提取液	0.10 ± 0.04	10.00 ± 5.48	0.04 ± 0.01	9.33 ± 5.32
	双黄连	0.05 ± 0.01 ²⁾	7.50 ± 2.74	0.05 ± 0.01	11.33 ± 3.01
汉黄芩素	黄芩提取液	0.08 ± 0.04	6.67 ± 2.58	0.08 ± 0.04	10.33 ± 3.67
	双黄连	0.05 ± 0.02	6.67 ± 2.58	0.07 ± 0.03	11.00 ± 2.76
千层纸素 A	黄芩提取液	0.09 ± 0.03	6.67 ± 2.58	0.05 ± 0.02	10.33 ± 3.67
	双黄连	0.12 ± 0.08	7.50 ± 2.74	0.04 ± 0.01	12.33 ± 3.21
黄芩苷	黄芩提取液	4.62 ± 2.25	1 700.90 ± 398.60	1 727.80 ± 384.80	0.006 ± 0.001
	双黄连	8.43 ± 4.45 ¹⁾	2 412.30 ± 888.10 ¹⁾	2 580.30 ± 867.50 ¹⁾	0.004 ± 0.002 ¹⁾
千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖苷	黄芩提取液	5.52 ± 3.52	657.50 ± 224.80	676.90 ± 211.40	0.016 ± 0.006
	双黄连	8.72 ± 4.78 ¹⁾	1 056.90 ± 413.80 ¹⁾	1 192.60 ± 517.30 ¹⁾	0.011 ± 0.007 ¹⁾
汉黄芩苷	黄芩提取液	4.47 ± 2.02	252.50 ± 103.00	255.30 ± 100.60	0.047 ± 0.026
	双黄连	7.78 ± 3.96 ¹⁾	536.40 ± 221.10 ¹⁾	592.40 ± 270.00 ²⁾	0.023 ± 0.018 ¹⁾
黄芩素	黄芩提取液	7.04 ± 2.85	35.10 ± 5.50	36.70 ± 5.50	0.278 ± 0.042
	双黄连	11.62 ± 3.12 ¹⁾	56.67 ± 19.50 ¹⁾	69.30 ± 20.74 ¹⁾	0.199 ± 0.074 ¹⁾
汉黄芩素	黄芩提取液	4.91 ± 1.79	5.70 ± 1.90	5.80 ± 1.80	0.191 ± 0.068
	双黄连	6.33 ± 1.93 ¹⁾	6.67 ± 2.72	7.00 ± 3.00	0.170 ± 0.083
千层纸素 A	黄芩提取液	4.13 ± 1.49	31.10 ± 7.80	31.30 ± 7.90	0.335 ± 0.079
	双黄连	8.27 ± 4.03 ¹⁾	37.40 ± 13.20	40.40 ± 13.10	0.269 ± 0.082

注:与黄芩提取液组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

取溶剂选择乙酸乙酯-水饱和正丁醇(1:1)混合液。

由表 2 可知,双黄连组新绿原酸、绿原酸及隐绿原酸的 C_{max} , AUC_{0-4} 和 $AUC_{0-\infty}$ 较金银花提取液组均显著提高, T_{max} 则显著降低,而 CL_z/F 呈降低趋势,表明双黄连组中 3 个酚酸的体内暴露程度明显提高,而消除速率减慢,与文献[4]报道一致。由图 2 可知,黄芩苷、千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素及千层纸素 A 药时曲线均呈双峰现象,可能是由于肠肝循环引起^[14-15]。由表 3 可知,与黄芩提取液组相比,双黄连组黄芩苷、黄芩素、千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖苷及汉黄芩苷生物利用度显著提高,吸收较快,但消除缓慢,而两组间汉黄芩素与千层纸素 A 的生物利用度未见明显差异。酚酸与黄酮类成分在复方中生物利用度较单味药组提高,而消除缓慢,推测酚酸与黄酮类成分可能为胃肠中某些酶的共同底物从而出现竞争性代谢^[16-17],进而影响其吸收特征,因而复方的药效优于单味药。本实验对双黄连与其单味药中 2 类成分的药代动力学进行了比较研究,可为该复方的配伍合理性研究提供科学依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:611.

[2] 梁业飞,周有旺. 双黄连口服液解热抗炎作用的实验研究[J]. 临床合理用药杂志,2011,4(9C):51-52.

[3] 莫红缨,赖克方,江永南,等. 双黄连及其拆方抗呼吸道合胞病毒作用的药效学研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2005,11(3):194-196.

[4] 莫红缨,赖克方,江永南,等. 双黄连对呼吸道合胞病毒感染的气道上皮细胞炎症因子释放的影响[J]. 广州医学院学报,2005,33(2):16-19.

[5] Gao R, Lin Y N, Liang G, et al. Comparative pharmacokinetic study of chlorogenic acid after oral administration of *Lonicerae Japonicae* Flos and Shuang-Huang-Lian in normal and febrile rats [J]. *Phytother Res*, 2014, 28(1):144-147.

[6] 周伟,狄留庆,毕肖林,等. 双黄连口服液中大鼠在体肠吸收研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(13):1733-1738.

[7] 殷爱玲,谈瑄忠. UPLC-MS/MS 同时测定双黄连片中 5 种有效成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(19):57-59.

[8] Ding Y, Dou J, Teng Z J, et al. Antiviral activity of

baicalin against influenza A (H1N1/H3N2) virus in cell culture and in mice and its inhibition of neuraminidase [J]. *Arch Virol*, 2014, 159(12):3269-3278.

[9] Gao Y, Feng L, Cai R L, et al. Shuang-Huang-Lian exerts anti-inflammatory and anti-oxidative activities in lipopolysaccharide-stimulated murine alveolar macrophages [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(4):461-469.

[10] Moghaddam E, Teoh B T, Sam S S, et al. Baicalin, a metabolite of baicalein with antiviral activity against dengue virus [J]. *Sci Rep*, 2014, doi: 10.1038/srep05452.

[11] Shin H S, Satsu H, Bae M J, et al. Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice [J]. *Food Chem*, 2015, 168:167-175.

[12] Di B, Feng N P, Liu W Y. Pharmacokinetic comparisons of Shuang-Huang-Lian with the different combinations of its constitutional herbs [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 107(3):401-405.

[13] Zhou W, Liu S J, Ju W Z, et al. Simultaneous determination of phenolic acids by UPLC-MS/MS in rat plasma and its application in pharmacokinetic study after oral administration of *Flos Lonicerae* preparations [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 86:189-197.

[14] Tong L, Wang M X, Zhang L H, et al. Simultaneous determination of baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, oroxylin A and chrysin of *Radix scutellariae* extract in rat plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 70:6-12.

[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] Ueng Y F, Shyu C C, Lin Y L, et al. Effects of baicalein and wogonin on drug-metabolizing enzymes in C57BL/6J mice [J]. *Life Sci*, 2000, 67(18):2189-2200.

[17] 朱立勤, 娄建石. 细胞色素 P450 与药物代谢的研究现状 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(10):1081-1086.

[责任编辑 刘德文]