

· 药物代谢 ·

## 聚乙二醇 400 对黄芩苷及其主代谢物胆汁排泄的影响

朱亚南, 张硕, 张敏, 王鹏娇, 孟小夏, 高秀丽\*

(贵州医科大学药学院, 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室,  
贵州省普通高等学校微生物与生化药学工程研究中心, 贵阳 550025)

**[摘要]** 目的: 考察药用辅料聚乙二醇 400 (PEG400) 对黄芩苷及其主代谢物黄芩素 6-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷 (B6G) 胆汁排泄的影响, 并分析其作用机制。方法: 大鼠随机分为黄芩苷 + 水组与黄芩苷 + PEG400 组, 利用 10% 水合氯醛 (剂量 4 mL·kg<sup>-1</sup>) 腹腔注射诱导麻醉, 制作大鼠胆管插管模型, 待大鼠完全清醒后, 以 168 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量的黄芩苷分别给大鼠灌胃相应的黄芩苷水溶液和黄芩苷 PEG400 溶液, 收集给药后 0~12 h 的胆汁, 使用 UPLC-MS/MS 测定不同时间段药物经胆汁排泄的浓度, 采用 Thermo Hypersil GOLD C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.9  $\mu$ m), 流动相乙腈 (A) -0.1% 甲酸水溶液 (B) 梯度洗脱 (0~9 min, 90%~27% B; 9~10 min, 27%~90% B; 10~12 min, 90% B), 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30  $^{\circ}$ C, 进样量 5  $\mu$ L; 质谱条件为电喷雾离子源 (ESI), 正离子检测模式。利用体外孵育法和酶联免疫吸附测定 (ELISA) 研究 PEG400 对尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 1A8 和 UGT1A9 活性及二者在大鼠肝脏中表达的影响。结果: 与黄芩苷 + 水组相比, 黄芩苷 + PEG400 组大鼠 12 h 内胆汁中黄芩苷及其主代谢物 B6G 的累积排泄量分别增加了 1.8, 2.1 倍; PEG400 分别使 UGT1A8 与 UGT1A9 的酶活性提高了 2.0, 1.5 倍, 使肝脏中 UGT1A8 与 UGT1A9 的质量分数提高了 2.2, 1.3 倍。结论: PEG400 可通过提高 UGT1A8 与 UGT1A9 的活性和表达来显著增加黄芩苷及其主代谢物 B6G 的胆汁排泄, 且对 B6G 胆汁排泄的促进作用大于原形药物黄芩苷, 可为 PEG400 的临床合理应用及黄芩苷等黄酮类药物新剂型的设计提供依据。

**[关键词]** 黄芩苷; 黄芩素 6-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷; 聚乙二醇 400 (PEG400); 胆汁; 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (UGT) 1A8; UGT1A9; 超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS)

**[中图分类号]** R22; R28; R94; C37; R969.1; O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)10-0088-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200653

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191202.1506.001.html>

**[网络出版时间]** 2019-12-03 15:31

## Effect of Polyethylene Glycol 400 on Bile Excretion of Baicalin and Its Main Metabolite

ZHU Ya-nan, ZHANG Shuo, ZHANG Min, WANG Peng-jiao, MENG Xiao-xia, GAO Xiu-li\*

(Guizhou Provincial College of Microbiology and Biochemical Pharmacy Engineering Center, State Key Laboratory of Functions and Application of Medicinal Plants, School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of polyethylene glycol 400 (PEG400) on rat bile excretion of baicalin and its main metabolite [baicalein 6-*O*- $\beta$ -D-glucuronide (B6G)], and to analyze its mechanism of action. **Method:** Rats were randomly divided into baicalin + water group and baicalin + PEG400 group, the anesthesia was induced by intraperitoneal injection of 10% chloral hydrate (dose of 4 mL·kg<sup>-1</sup>) to prepare a rat bile duct intubation model. After the rats were fully awake, rats were given baicalin aqueous solution and baicalin PEG400 solution with dose of 168 mg·kg<sup>-1</sup> for baicalin, respectively. And bile was collected from 0 h to 12 h after administration. UPLC-MS/MS was used to determine the concentration of drug excreted through bile at different time periods. Thermo Hypersil GOLD C<sub>18</sub> column was used with acetonitrile (A) -0.1% formic acid

**[收稿日期]** 20191017(009)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (81160413); 贵州省科技厅项目 (黔科合成果转字 [2015] 5213 号)

**[第一作者]** 朱亚南, 在读硕士, 从事新药研发及体内药物分析研究, E-mail: 2726719792@qq.com

**[通信作者]** \* 高秀丽, 教授, 从事新药研发及体内药物分析研究, E-mail: gaoxl@gmc.edu.cn

solution (B) as the mobile phase for gradient elution (0-9 min, 90% -27% B; 9-10 min, 27% -90% B; 10-12 min, 90% B), the flow rate was  $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , the column temperature was  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , the injection volume was  $5 \text{ } \mu\text{L}$ . The mass spectra were obtained in positive ion mode with electrospray ionization (ESI). The effects of PEG400 on the activities and expressions in rat liver of uridine diphosphate glucuronyltransferase (UGT) 1A8 and UGT1A9 were studied *in vitro* incubation assay and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Compared with the baicalin + water group, in the baicalin + PEG400 group, the bile cumulative excretions of baicalin and B6G increased by 1.8 times and 2.1 times within 12 h, respectively. PEG400 increased the enzyme activities of UGT1A8 and UGT1A9 by 2.0 times and 1.5 times, and their concentrations in liver were increased by 2.2 times and 1.3 times, respectively. **Conclusion:** PEG400 can significantly increase the bile excretion of baicalin and its main metabolite B6G by enhancing the activities and expressions of UGT1A8 and UGT1A9, and its promoting effect on bile excretion of B6G is greater than that of baicalin, which provides a basis for the rational clinical application of PEG400 and the design of new dosage forms of flavonoids such as baicalin.

[ **Key words** ] baicalin; baicalein 6-*O*- $\beta$ -*D*-glucuronide; polyethylene glycol 400 (PEG400); bile; uridine diphosphate glucuronyltransferase (UGT) 1A8; UGT1A9; ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)

黄芩苷属黄酮类化合物,是黄芩的主要成分之一,同时也是黄芩及其制剂的主要质量控制指标成分。近年来,随着对黄芩苷的研究深入,发现黄芩苷具有保肝、利胆、抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗病毒和抗氧化等广泛的药理作用<sup>[1-5]</sup>。已有研究表明<sup>[6]</sup>,黄芩苷主要经胆汁排泄,当黄芩苷随胆汁排到肠道后,会在肠道菌群分泌的 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶(GUS)的作用下水解为其苷元黄芩素,然后黄芩素又在肝肠等部位,分别在对黄酮类药物影响较大的尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGT)的2个亚型UGT1A9及UGT1A8的作用下转化成黄芩苷和及其主代谢物黄芩素6-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖醛酸苷(B6G,黄芩苷的同分异构体),并以这2个糖苷的形式重新经胆汁排泄,此过程称为肝肠循环。其可以延缓药物的半衰期,使药物在血液中长期保持有效浓度<sup>[7-10]</sup>。

过去,人们认为药用辅料没有生理活性,且不影响主药在药物应用中的功效,尚未充分认识到药用辅料对药物的释放、生物利用度及靶向性的影响,实际上,不存在绝对无活性的药用辅料<sup>[11]</sup>。越来越多的研究表明,药用辅料可能会改变药物的稳定性及其从制剂中释放的速度,并且能够影响胃肠道转运蛋白[如P-糖蛋白(P-gp)等]的功能,从而影响药物的吸收、分布、代谢与排泄<sup>[12-13]</sup>。聚乙二醇400(PEG400)是常用的药用辅料,已被广泛用于含活性成分黄芩苷的中药复方制剂(如银黄含化滴丸和茵栀黄软胶囊等)中。前期研究表明PEG400提高了黄芩苷在大鼠体内的吸收<sup>[14]</sup>,但关于其是否会对黄芩苷的胆汁排泄产生影响尚不清楚。本实验拟采用

UPLC-MS/MS考察PEG400对黄芩苷及其主代谢物B6G胆汁排泄的影响,研究PEG400对UGT1A8与UGT1A9酶活性及其在大鼠肝脏中表达的影响,以揭示PEG400对黄芩苷及其主要代谢物B6G胆汁排泄的影响机制,为提高该辅料的临床应用及其他黄酮类化合物新剂型的设计提供参考。

## 1 材料

UltiMate 3000型超高效液相色谱-TSQ Quantum型三重四极杆串联质谱(美国Thermo公司),Allegra BHR型超高速冷冻离心机(美国Beckman公司),Vibrax VXR basic型自动漩涡振荡仪(德国IKA公司),D101型氮吹仪(杭州蓝焰科技有限公司),2XZ-1型旋片式真空泵(浙江黄岩黎明实业有限公司),AB104-N型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司),BBS-V800型超净工作台(苏州净化设备总厂),DK-98-II A型电热水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司),Polytron 1200E手持组织匀浆机(瑞士Kinematica公司)。

黄芩素、黄芩苷、染料木素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110715-201214,110715-201312,110714-201216,纯度均 $\geq 98\%$ ),黄芩苷原料药(陕西昊辰生物科技有限公司,批号HQ190916,纯度 $\geq 90\%$ ),黄芩素6-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖醛酸苷(B6G)对照品(深圳爱拓化学有限公司,批号XB1616611901,纯度 $\geq 98\%$ ),三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,批号20180912),聚乙二醇400(PEG400,西陇化工股份有限公司,批号141025),尿苷二磷酸葡萄糖醛

酸转移酶 1A8/1A9 (UGT1A8/UGT1A9, 上海权阳生物科技有限公司, 批号分别为 8036001, 8120004), UGT1A8 和 UGT1A9 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测试剂盒 (上海仁捷生物科技有限公司, 批号分别为 E20190617-35752, E20190620-34550), 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸 (UDPGA, 上海源叶生物科技有限公司, 批号 63700-19-6), 甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 ( $230 \pm 20$ ) g, 由贵州医科大学实验动物中心提供, 许可证号 SYXK (黔) 2018-0001, 批准号 1800980。大鼠严格按照实验动物护理和使用指南饲养。将大鼠饲养在室温 ( $22 \pm 2$ ) °C 和湿度  $55\% \pm 5\%$  的环境中, 光照 12 h 循环, 自由饮水。本实验所涉及动物的相关操作均在贵州医科大学实验动物伦理委员会的批准下进行, 并严格遵循相关准则。

## 2 方法

### 2.1 UPLC-MS/MS 检测方法的建立

**2.1.1 色谱条件** Thermo Hypersil GOLD C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.9 μm), 带有 Hypersil GOLD C<sub>18</sub> 预柱 (2.1 mm × 10 mm, 1.9 μm), 流动相乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 9 min, 90% ~ 27% B; 9 ~ 10 min, 27% ~ 90% B; 10 ~ 12 min, 90% B), 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 进样量 5 μL。

**2.1.2 质谱条件** 电喷雾离子源 (ESI), 检测方式为正离子模式, 碰撞气为氩气, 辅助气为氮气 (N<sub>2</sub>), 离子源电压 3.5 kV, 毛细管电压 2.5 kV, 毛细管温度 375 °C, 雾化器温度 275 °C; 黄芩苷, B6G, 染料木素的碰撞能量 (CE) 分别为 21, 21, 27 eV; 透镜电压分别为 150, 152, 183 V; 采用选择反应监测 (SRM) 方式进行测定; 用于定量分析的离子对分别为  $m/z$  447 ~ 271 (黄芩苷和 B6G);  $m/z$  271 ~ 153 (染料木素)。见图 1。

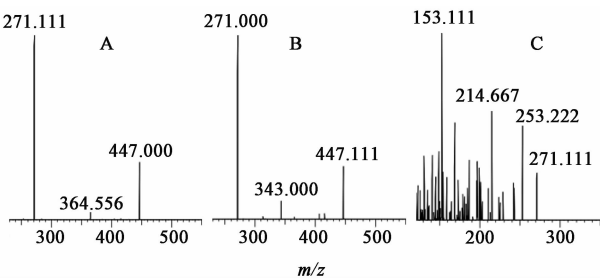


图 1 黄芩苷 (A), B6G (B) 和染料木素 (C) 的 MS/MS

Fig.1 MS/MS of baicalin (A), B6G (B) and genistein (C)

**2.2 溶液的配制** 分别精密称取适量的黄芩苷及

B6G 对照品, 用甲醇超声使溶解并定容于 10 mL 量瓶中, 得质量浓度分别为 400, 130 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品储备液。精密称取一定量的染料木素对照品, 用甲醇稀释成 10 mg·L<sup>-1</sup> 内标溶液。

**2.3 排泄试验** 取 SD 大鼠 12 只, 随机分为黄芩苷 + 水组和黄芩苷 + PEG400 组, 每组 6 只, 禁食但可自由饮水 12 h, 用 10% 水合氯醛 (剂量 4 mL·kg<sup>-1</sup>) 腹腔注射诱导麻醉, 将聚乙烯 (PE) 插管 (直径 0.7 mm) 插入大鼠胆管中制作胆管插管模型, 待大鼠完全清醒后按黄芩苷剂量 168 mg·kg<sup>-1</sup> 灌胃给予相应的混悬溶液 (药物与溶剂按 1:10 的比例加入相应体积的生理盐水或 PEG400, 超声并混匀后得到灌胃所需要的混悬溶液)。收集给药后 0 ~ 2, 2 ~ 4, 4 ~ 6, 6 ~ 8, 8 ~ 10, 10 ~ 12 h 的胆汁, 准确量取体积, -20 °C 保存待测。

**2.4 胆汁样品的处理** 将大鼠胆汁样品置室温下解冻后取 100 μL 于 5 mL 的离心管中, 依次加入内标溶液 10 μL 和 0.5 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液 50 μL, 涡旋混合 30 s, 加入乙酸乙酯 2 mL 后震荡 10 min 进行萃取, 在 4 000 r·min<sup>-1</sup>, 4 °C 离心 10 min, 取上清液于 40 °C 下氮气吹干, 加甲醇 1 mL 复溶, 在 12 000 r·min<sup>-1</sup>, 4 °C 离心 10 min 后取上清液 5 μL 注入 UPLC-MS/MS 系统进行分析。

### 2.5 标准曲线的制备与方法学考察

**2.5.1 专属性考察** 取大鼠空白胆汁、空白胆汁 + 混合对照品 + 内标溶液以及大鼠口服黄芩苷水溶液后 2 ~ 4 h 的胆汁样品, 按 2.4 项下方法进行预处理, 按 2.1 项下条件测定, 记录色谱图以考察该方法的专属性。

**2.5.2 标准曲线及线性范围** 精密吸取大鼠空白胆汁 100 μL, 分别加入 6 个质量浓度的黄芩苷和 B6G 的混合对照品溶液, 按 2.4 项下方法进行预处理, 得系列质量浓度的胆汁样品, 按 2.1 项下条件测定, 以待测物质量浓度为横坐标 (X), 待测物与内标的峰面积之比为纵坐标 (Y), 利用加权最小二乘法 (权重为 1/X<sup>2</sup>) 进行线性回归分析, 分别得到黄芩苷及 B6G 的线性回归方程。

**2.5.3 精密度和准确度考察** 按 2.5.2 项下方法分别配制含黄芩苷 (23.44, 375, 3 000 μg·L<sup>-1</sup>) 及 B6G (6.25, 100, 800 μg·L<sup>-1</sup>) 低、中、高质量浓度的大鼠胆汁质控 (QC) 样品各 6 份, 按 2.4 项下方法进行预处理, 按 2.1 项下条件连续测定 3 d, 记录峰面积。以当日标准曲线计算 QC 样品质量浓度, 计算日内与日间精密度的 RSD 与准确度 (RE)。

**2.5.4 萃取回收率、基质效应与稳定性试验** 取大鼠空白胆汁 100  $\mu\text{L}$ , 按 2.5.2 项下方法分别配制含黄芩苷及 B6G 低、中、高质量浓度的大鼠胆汁 QC 样品各 6 份, 按 2.4 项下方法进行预处理, 按 2.1 项下条件测定, 记录峰面积(A)。另取空白胆汁 100  $\mu\text{L}$ , 按 2.4 项下方法进行预处理, 向上清液中加入低、中、高质量浓度的黄芩苷与 B6G 对照品溶液, 按 2.1 项下条件测定, 记录峰面积(B); 取上述低、中、高质量浓度的对照品溶液, 按 2.1 项下条件测定, 记录峰面积(C)。计算萃取回收率( $A/B \times 100\%$ )和基质效应( $B/C \times 100\%$ )。按 2.5.2 项下方法分别配制含黄芩苷及 B6G 低、中、高质量浓度的 QC 样品, 按 2.4 项下方法操作, 考察不同储存条件下样品的稳定性(室温放置 24 h, 10  $^{\circ}\text{C}$  自动进样器中保持 12 h, 于 -80  $^{\circ}\text{C}$  反复冻融 3 次, -80  $^{\circ}\text{C}$  下放置 20 d)。

### 2.6 UGT1A8 和 UGT1A9 酶活性和质量分数的测定

**2.6.1 酶活性** 设定黄芩素组和黄芩素 + PEG400 组, 每组重复 6 个样品。200  $\mu\text{L}$  的孵育体系, 其中包含 0.05  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  UGT1A8 或 0.025  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  UGT1A9, 1  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  UDPGA, 10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , 0.2  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  黄芩素底物<sup>[15]</sup>和 Tris-HCl 缓冲液 2  $\mu\text{L}$ (黄芩素组)或 PEG400 溶液 2  $\mu\text{L}$ (黄芩素 + PEG400 组), 不足 200  $\mu\text{L}$  时, 其余使用 50  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)补足, 将整个孵育体系置于 37  $^{\circ}\text{C}$  的水浴中孵育 15 min(UGT1A8)或 20 min(UGT1A9)。孵育完成后加入含 10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  染料木素溶液的乙腈 100  $\mu\text{L}$  终止反应, 于 2 万  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min, 取上清液 5  $\mu\text{L}$  注入 UPLC-MS/MS 系统进行分析。UGT1A8 和 UGT1A9 的酶活性单位为  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 一个单位(U)定义为在 1 min 内产生黄芩素(底物)的代谢物黄芩苷或 B6G 共 1  $\mu\text{mol}$  所用酶的量。

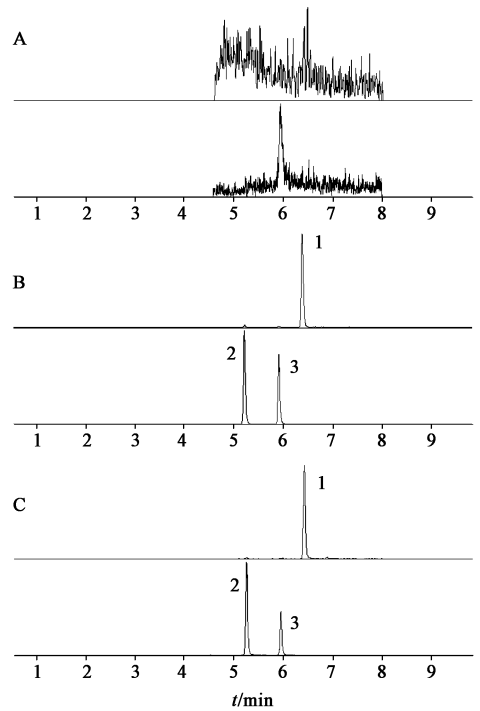
**2.6.2 酶质量分数** 将 12 只雄性大鼠随机分为水组和 PEG400 组(每组 6 只), 以 1.68  $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  的剂量连续灌胃生理盐水或 PEG400, 共 1 周(每天 2 次), 通过股动脉放血处死, 迅速取出大鼠肝脏, 磷酸盐缓冲盐(PBS, pH 7.4)洗净血迹后用滤纸擦干, 准确称重。将所取肝脏组织与 PBS 按比例 1:9 混合, 加入蛋白酶抑制剂并在冰浴中匀浆, 于 4  $^{\circ}\text{C}$ , 3 500  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 得上清液。按 ELISA 试剂盒说明书进行测定。UGT1A8 和 UGT1A9 的质量分数单位为  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ , 表示 1 g 鲜重样品中所含 UGT1A8 与 UGT1A9 的质量。

**2.7 数据处理** 胆汁样品经过处理后, 取 5  $\mu\text{L}$  进

样分析, 记录峰面积, 代入相应的标准曲线, 分别得到黄芩苷及 B6G 在胆汁中的含量, 与稀释倍数相乘得到胆汁中药物的实际浓度, 再与相应时间段内采集到的胆汁体积相乘, 即可得到不同时间段内药物经胆汁的累积排泄量, 绘制药物流量排泄曲线。所有数据使用  $\bar{x} \pm s$  表示, 利用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析, 采用  $t$  检验进行组间比较, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 专属性考察** 大鼠空白胆汁、空白胆汁 + 混合对照品 + 内标溶液以及大鼠口服黄芩苷水溶液后 2~4 h 的胆汁样品的 SRM 色谱图见图 2。结果发现黄芩苷, B6G 和染料木素的保留时间( $t_R$ )分别为 5.28, 5.95, 6.47 min; 空白胆汁中的内源性物质对待测物和内标的测定没有明显干扰。



A. 空白胆汁; B. 空白胆汁 + 混合对照品 + 内标; C. 供试品; 1. 内标(染料木素); 2. 黄芩苷; 3. B6G

图 2 大鼠口服黄芩苷水溶液后 2~4 h 胆汁样品的 UPLC  
Fig. 2 UPLC of bile samples from rats after oral administration of baicalin solution for 2-4 h

**3.2 标准曲线与线性范围** 黄芩苷与 B6G 在大鼠胆汁中的线性回归方程分别为  $Y = 0.133 2X + 0.811 4$  ( $R^2 = 0.999 1$ ),  $Y = 0.197 2X + 0.099 0$  ( $R^2 = 0.998 4$ ), 线性范围分别为 23.44 ~ 3 000, 6.25 ~ 800  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 根据信噪比  $S/N \geq 10$ , 确定定量限分别为 2.57, 1.35  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**3.3 精密度和准确度考察** 2 种待测物的低、中、

高质量浓度 QC 样品日间和日内精密度的 RSD 均 < 15%。RE 处于 -6.5% ~ 5.5%，说明精密度和准确度均符合要求，见表 1。

表 1 大鼠胆汁样品中 B6G 及黄芩苷 UPLC-MS/MS 分析的精密度和准确度考察 (n=6)

Table 1 Precision and accuracy and of baicalin and B6G in rat bile samples by UPLC-MS/MS (n=6) %

待测物	质量浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	日内		日间	
		精密度 RSD	RE	精密度 RSD	RE
黄芩苷	23.44	8.8	-4.1	9.6	-5.2
	375	4.5	-2.2	2.8	4.3
	3 000	5.7	5.5	6.1	-6.5
B6G	6.25	10.9	-2.1	4.4	5.3
	100	5.2	-4.2	5.1	-4.8
	800	6.5	2.9	5.6	2.1

**3.4 萃取回收率、基质效应及稳定性试验** 黄芩苷, B6G 和内标的平均萃取回收率和平均基质效应分别为 80.72% ~ 98.55% 和 85.73% ~ 99.85%，RSD 分别为 3.2% ~ 9.1% 和 2.9% ~ 7.4%。表明该方法的平均萃取回收率达到生物样品测定的要求, 无明显的基质效应。含黄芩苷和 B6G 低、中、高质量浓度的 QC 样品在室温下放置 24 h 后 RE 处于 -6.7% ~ 3.2%，RSD < 10.4%；-80 °C 反复冻融 3 次后 RE 处于 -4.8% ~ 8.9%，RSD < 9.3%；于温度 -80 °C 放置 20 d 后 RE 处于 -7.6% ~ 6.4%，RSD < 7.7%；10 °C 进样器中放置 12 h 后 RE 处于 -5.1% ~ 3.6%，RSD < 11.2%。表明样品未见明显的降解, 依然保持良好的稳定性。

**3.5 PEG400 对黄芩苷及 B6G 胆汁排泄的影响** 通过收集不同时间段内的大鼠胆汁, 记录体积并检测, 计算不同时间段内 2 个待测物的胆汁累积排泄量, 考察加入辅料 PEG400 后, 黄芩苷及 B6G 的胆汁排泄特征, 见图 3, 4。结果发现与黄芩苷 + 水组比较, 黄芩苷 + PEG400 组大鼠 12 h 内胆汁中黄芩苷及其主代谢物 B6G 的累积排泄量分别提高了 1.8 倍和 2.1 倍。说明 PEG400 对代谢物 B6G 胆汁排泄的促进作用大于对原形药物黄芩苷的促进作用。

**3.6 UGT1A8 和 UGT1A9 的酶活性和质量分数测定** 采用体外孵育法和 ELISA 考察 PEG400 对 UGT1A8 与 UGT1A9 酶活性和蛋白表达的影响, 以揭示 PEG400 对黄芩苷与 B6G 胆汁排泄的影响机制。结果黄芩素组中 UGT1A8 与 UGT1A9 的酶活性分别为  $(12.01 \pm 3.12)$ ,  $(3.10 \pm 0.20)$   $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ；黄芩素 + PEG400 组中 UGT1A8 与 UGT1A9 的酶活性

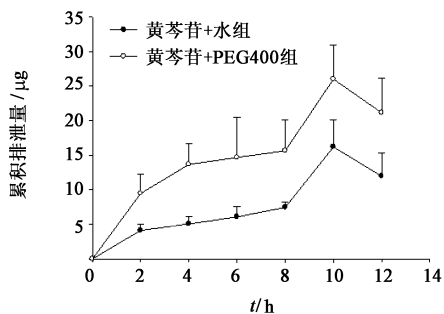


图 3 黄芩苷的胆汁累积排泄曲线 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
Fig. 3 Cumulative excretion curves of baicalin in bile ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

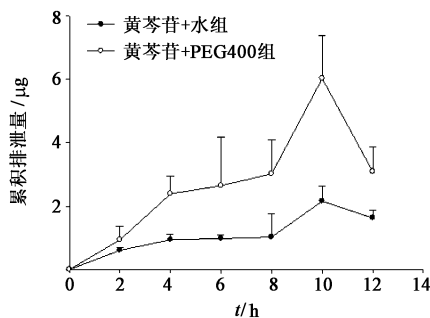


图 4 B6G 的胆汁累积排泄曲线 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
Fig. 4 Cumulative excretion curves of B6G in bile ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

分别为  $(24.02 \pm 5.00)$ ,  $(4.70 \pm 1.10)$   $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ；与黄芩素组相比, PEG400 分别使 UGT1A8 与 UGT1A9 的酶活性提高了 2.0 倍和 1.5 倍。水组中 UGT1A8 与 UGT1A9 的质量分数分别为  $(2.73 \pm 0.24)$ ,  $(88.89 \pm 4.39)$   $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ；PEG400 组中 UGT1A8 与 UGT1A9 的质量分数分别为  $(6.00 \pm 0.45)$   $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  和  $(114.64 \pm 18.03)$   $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ；与水组相比, PEG400 分别使大鼠肝脏中 UGT1A8 与 UGT1A9 的质量分数提高了 2.2 倍和 1.3 倍。因黄芩苷是以其苷元黄芩素的形式吸收, 黄芩素经肝肠循环, 分别在肝脏中的 II 相代谢酶 UGT1A8 与 UGT1A9 的作用下发生生物转化后以其糖苷 B6G 及黄芩苷的形式经胆汁排泄, PEG400 显著提高了 UGT1A8 的酶活性及蛋白表达, 且强于对 UGT1A9 的作用, 此结果验证了 PEG400 对代谢物 B6G 胆汁排泄的促进作用大于原形药物黄芩苷的结论。

#### 4 讨论

本实验采用 UPLC-MS/MS, 体外孵育法和 ELISA 研究 PEG400 对黄芩苷及其主代谢物 B6G 胆汁排泄的影响, 结果显示 PEG400 可通过提高 UGT1A8 与 UGT1A9 的酶活性和表达来促进黄芩苷及 B6G 的胆汁排泄。本课题组前期关于 PEG400 对黄芩苷药代动力学影响的研究显示, 黄芩苷 + 水组中黄芩苷的药峰浓度 ( $C_{\text{max}}$ ) 和药时曲线下面积

( $AUC_{0-t}$ ) 分别为  $(4.76 \pm 2.71) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(40.72 \pm 12.73) \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 黄芩苷 + PEG400 组中黄芩苷的  $C_{\text{max}}$  和  $AUC_{0-t}$  分别为  $(9.17 \pm 5.66) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(82.22 \pm 42.99) \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ , 提示 PEG400 显著提高了黄芩苷在大鼠体内的吸收。本研究中 PEG400 增加了黄芩苷及其主代谢物 B6G 的胆汁排泄, 促使从胆汁排至肠道的黄芩苷及 B6G 浓度增加, 通过肝肠循环与重吸收, 这 2 个药物进入血液中的浓度随之增加, 从而也证明了 PEG400 对黄芩苷及 B6G 的肝肠循环和重吸收过程具有一定的促进作用。

有研究表明 P-糖蛋白 (P-gp) 参与了药物从血液中分泌到尿、胆汁和肠道的过程, 同时也可防止外源性物质及有害代谢物进入机体<sup>[16]</sup>, 且 PEG400 对肠道 P-gp 具有抑制作用<sup>[17]</sup>, 从而抑制药物的外排。但也有文献报道, 黄芩苷并不是 P-gp 的底物<sup>[18]</sup>, 所以即使 PEG400 对 P-gp 具有抑制作用, 也不抑制黄芩苷的外排, 本文研究结果表明 PEG400 促进了黄芩苷的胆汁排泄, 这对此推论具有一定的支撑作用。MA 等<sup>[19]</sup> 研究发现二苯乙烯苷可下调大鼠肝脏和小肠中 UGT1A8 和 UGT1A9 mRNA 的表达, 从而抑制了大黄的葡萄糖醛酸化过程, 证明大鼠肝脏和小肠等部位具有这 2 个代谢酶的表达, 基于此, 本文结合体内外实验研究 PEG400 对 UGT1A8 和 UGT1A9 酶活性和表达的影响, 发现 PEG400 提高了这 2 个酶的活性和表达, 可在一定程度上阐释 PEG400 对黄芩苷及其主代谢物 B6G 胆汁排泄影响的机制。另外, 药物的胆汁排泄与很多转运体蛋白与代谢酶 [如 P-gp, 多药耐药相关蛋白 (MRP) 和 UGT 等] 密切相关, 推测药用辅料对药物胆汁排泄的影响极有可能与相关转运体有关, 但具体的影响机制还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] LAI W W, JIA J T, YAN B, et al. Baicalin hydrate inhibits cancer progression in nasopharyngeal carcinoma by affecting genome instability and splicing [J]. *Oncotarget*, 2017, 9(1): 901-914.  
[2] KIM K H, PARK Y D, PARK H, et al. Synthesis and biological evaluation of a novel baicalein glycoside as an anti-inflammatory agent [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 744: 147-156.  
[3] TSANG W K, CHAU K Y, YANG H P. Baicalein exhibits inhibitory effect on the energy-dependent efflux pump activity in non-albicans *Candida* fungi. [J]. *J Chemotherapy*, 2015, 27(1): 61-62.  
[4] GAO L, FANG J S, BAI X Y, et al. In silico target fishing for the potential targets and molecular mechanisms of baicalein as an antiparkinsonian agent;

discovery of the protective effects on NMDA receptor-mediated neurotoxicity [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2013, 81(6): 675-687.  
[5] 蒋寅, 刘军楼, 朱磊, 等. 黄芩苷对 HT-29 细胞炎症模型 PI3K/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响及机制探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(12): 118-122.  
[6] 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.  
[7] AKAO T, KAWABATA K, YANAGISAWA E. Baicalin, the predominant flavone glucuronide of *Scutellariae Radix*, is absorbed from the rat gastrointestinal tract as the aglycone and restored to its original form [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2000, 52(12): 1563-1568.  
[8] WU B J, KULKARNI K, BASU S, et al. First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics [J]. *J Pharm Sci*, 2011, 100(9): 3655-3681.  
[9] ZHANG L, LIN G, ZUO Z. Involvement of UDP-glucuronosyltransferases in the extensive liver and intestinal first-pass metabolism of flavonoid baicalein [J]. *Pharm Res*, 2012, 24(1): 81-89.  
[10] ZHANG L, LIN G, KOVACS B, et al. Mechanistic study on the intestinal absorption and disposition of baicalein [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 31(3/4): 221-231.  
[11] 刘峥, 周淑媛, 李伟, 等. Liguzinediol 对正常大鼠离体心脏的正性肌力作用 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2009, 28(4): 293-296.  
[12] GIACOMINI K M, HUANG S M, TWEEDIE D J, et al. Membrane transporters in drug development [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(3): 215-236.  
[13] HILLGREN K M, KEPPLER D, ZUR A A, et al. Emerging transporters of clinical importance: an update from the international transporter consortium [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2013, 94(1): 52-63.  
[14] 顾腾, 张硕, 张敏, 等. 菌群失调大鼠体内 PEG400 对黄芩苷和黄芩素药代动力学的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(5): 1034-1040.  
[15] ZHANG Z, MA G, XUE C F, et al. Establishment of rat liver microsome-hydrogel system for *in vitro* phase II metabolism and its application to study pharmacological effects of UGT substrates [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2019, 34(2): 141-147.  
[16] LI Y, YUAN H, YANG K, et al. The structure and functions of P-glycoprotein [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(8): 786-800.  
[17] 黄建耿. 药用辅料抑制肠道 P-糖蛋白药泵作用研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2008.  
[18] ZHU M L, LIANG X L, ZHAO L J, et al. Elucidation of the transport mechanism of baicalin and the influence of a *Radix Angelicae Dahuricae* extract on the absorption of baicalin in a Caco-2 cell monolayer model [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(2): 553-559.  
[19] MA J, ZHENG L, DENG T, et al. Stilbene glucoside inhibits the glucuronidation of emodin in rats through the down-regulation of UDP-glucuronosyltransferases 1A8: application to a drug-drug interaction study in *Radix Polygoni Multiflori* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 147(2): 335-340.

[责任编辑 刘德文]