

黄芩苷灌胃给药经兔眼血 房水屏障的通透性*

侯勇生¹,张肖宁²,弥树勇³,傅少颖¹,崔浩¹

(1 哈尔滨医科大学第一临床医学院眼科,哈尔滨 150001; 2 黑龙江省药品检验所,哈尔滨 150001;

3 哈尔滨医科大学第四临床医学院眼科,哈尔滨 150001)

[摘要] 目的:研究黄芩苷灌胃给药经兔眼血 房水屏障的通透性。方法:建立测定黄芩苷兔眼房水和血浆药物浓度的 HPLC方法,色谱条件:Diomonsil C₁₈色谱柱(200 mm ×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.2%磷酸溶液(47:53);流速为 1.0 mL·min⁻¹;检测波长为 279 nm;柱温为 35℃;以对二甲氨基苯甲醛为内标物。健康纯种日本长耳白兔单剂量灌胃黄芩苷 80 mg·kg⁻¹后,比较不同时间兔眼房水和血浆药物浓度,绘制药物流入眼内浓度-时间曲线,用 3p87药动学软件计算黄芩苷在房水和血浆中的药动学参数。结果:在本色谱条件下,黄芩苷在房水和血浆中的线性范围分别为 0.02~0.25和 0.0125~24.0 mg·L⁻¹,相关系数(*r*)分别为 0.9968和 0.9982。黄芩苷在房水中的 AUC_{0-12h}显著低于血浆[(0.639 ±0.067) vs (80.1 ±2.1) h·mg·L⁻¹, *P* < 0.01],各个时间点比较,黄芩苷在房水中的质量浓度均显著低于其血浆中的质量浓度(*P* < 0.01)。结论:黄芩苷经灌胃给药较难通过血 房水屏障进入眼内。

[关键词] 黄芩苷;血 房水屏障;高效液相色谱法;药动学

[中图分类号] R965.1; R772.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2008)13-1134-04

Ability of baicalin penetrating blood-aqueous barrier after intragastric administration in rabbits

HOU Yong-sheng¹, ZHANG Xiao-ning², MI Shu-yong³, FU Shao-ying¹, CUI Hao¹

(1 Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China;

2 Heilongjiang Provincial Institute of Drug Control, Harbin 150001, China; 3 Department of Ophthalmology,

the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

[Abstract] **Objective:** To study the ability of baicalin penetrating blood-aqueous barrier after intragastric administration in rabbits. **Methods:** An HPLC method for determining baicalin level in aqueous humor and plasma was established. The HPLC condition was as follows: a Diamonsil C₁₈ column (200 mm ×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase composed of methanol and 0.2% phosphate (47:53), a 279 nm UV detector, a column temperature of 35℃, and a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and an internal standard of p-dimethylaminobenzaldehyde. Mean baicalin concentration-time curve was plotted after single dose of baicalin 80 mg·kg⁻¹, and the pharmacokinetic parameters were evaluated using 3p87 statistic software. **Results:** The linear ranges of baicalin in aqueous humor and plasma were 0.02~0.25 mg·L⁻¹ (*r*=0.9968) and 0.0125~24.0 mg·L⁻¹ (*r*=0.9968), respectively. The AUC of baicalin was markedly lower in aqueous humor than in plasma [(0.639 ±0.067) vs (80.1 ±2.1) h·mg·L⁻¹, *P* < 0.01]; the concentration of baicalin was also significantly lower in aqueous humor than in plasma at all the designed time points (*P* < 0.01). **Conclusion:** The ability of baicalin penetrating blood-aqueous barriers into the eye is very poor after intragastric administration.

[Key words] baicalin; blood-aqueous barrier; HPLC; pharmacokinetics

黄芩苷是从唇形科植物黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi)的干燥根中提取得到的一种黄酮类化合物。黄芩苷是多种中药制剂的有效成分,是黄芩及其制剂的主要质量控制指标,也是服药后体内浓度的控制指标^[1]。黄芩苷的主要药理作用为抗氧化、清除自由基、抗菌、抗病毒、抗炎、抗变态反应、抗肿瘤、

降压利尿、阻滞钙离子通道、抑制醛糖还原酶等,现已广泛应用于临床,对免疫、心脑血管、消化和神经等系统均有保护作用^[2-6]。近年来黄芩苷在眼科的应用日益增加,主要采用局部应用的方法治疗病毒性角膜炎^[7-8]。而关于黄芩苷全身用药在眼房水液中的药动学研究,作者未见国内外文献报道。本实验在文

*基金项目:黑龙江省中医药管理局科研项目(060018)

献^[9-10]基础上,进行测定条件优化,采用 HPLC法分别测定黄芩苷灌胃后不同时间点兔眼房水和血浆中的质量浓度,考察黄芩苷全身用药的血-房水屏障通透性,为黄芩苷全身用药治疗眼病提供实验依据。

材料与amp;方法

实验材料

1.1 仪器 Agilent1100高效液相色谱仪;G1314A紫外可见检测器;G1311A自动进样器;安捷伦色谱工作站;METTLER AE240分析天平;XW-80型涡旋混合器;TGL-16G型高速台式离心机;超声波清洗器。

1.2 试药 黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110715-200212);黄芩苷原料(黑龙江省药品检验所,纯度 93%);内标物对二甲氨基苯甲醛(沈阳试剂厂);甲醇、乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯;水为纯化水。

1.3 实验动物 健康纯种日本长耳白兔 48只(哈尔滨医科大学第一临床医学院动物室提供,动物合格证书号:黑动字第 P01105002号),雌雄不限,经裂隙灯检查证实无眼前节病变,体重 2.0~2.5 kg。

动物分组

52只日本长耳白兔随机分为 13组,每组 4只 8眼。白兔禁食禁水 12 h后,以 80 mg·kg⁻¹黄芩苷灌胃给药(黄芩苷溶解于纯化水中),灌胃体积 20 mL·kg⁻¹。于给药前和给药后 0.083,0.167,0.25,0.5,0.75,1,1.5,2,3,5,8和 12 h取血约 400 μL,立即离心(5 000 r·min⁻¹,10 min),分离血浆,于 -20 °C冰箱

保存,直至分析。采血后处死家兔(耳缘静脉空气栓塞法),取房水约 200 μL置 -20 °C冰箱保存,直至分析。

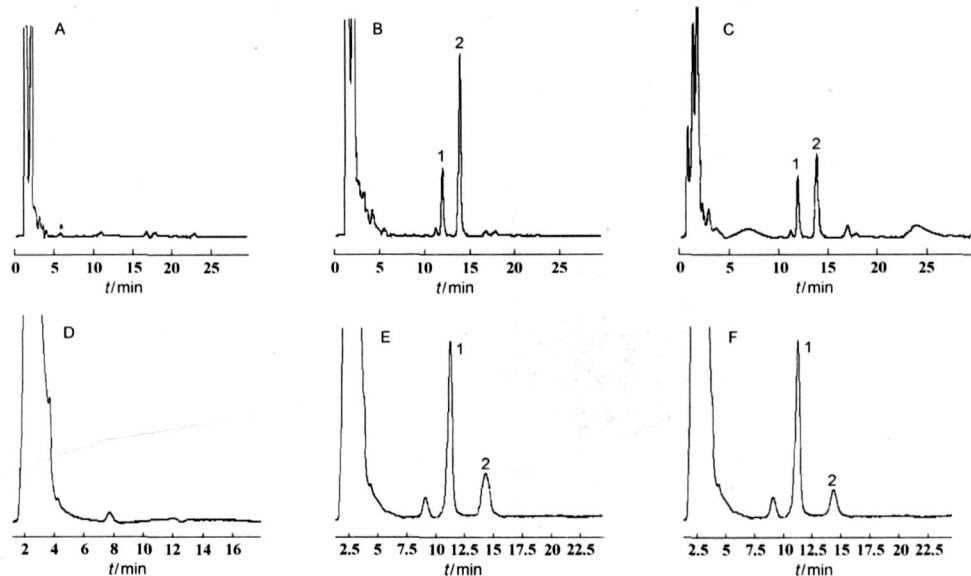
3 房水和血浆中黄芩苷浓度测定的 HPLC法

3.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.2%磷酸溶液(47:53),pH=2.5;流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:279 nm;柱温:35 °C。

3.2 样品处理 分别取不同时间组血浆 200 μL置于肝素化离心管中,依次加入纯化水 200 μL,内标溶液(20 mg·L⁻¹对二甲氨基苯甲醛甲醇溶液)100 μL,乙腈 400 μL,漩涡振荡混匀 5 min,超声 5 min,5 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液 20 μL进样,记录色谱图。

分别取不同时间组的房水 100 μL,依次加入内标溶液(2 mg·L⁻¹对二甲氨基苯甲醛甲醇溶液)100 μL,乙腈 100 μL,漩涡振荡混匀 1 min,超声 5 min,5 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液 40 μL进样,记录色谱图。

3.3 方法专属性 取兔空白血浆、房水,分别按“3.2项下依法操作,得空白血浆、房水色谱图;将一定浓度的黄芩苷标准液、内标溶液加入空白血浆、房水得色谱图;取白兔灌胃黄芩苷后采集的血浆、房水样品得色谱图,见图 1。从图 1中可见,基线噪音较小,血浆、房水中代谢物峰及其他内源性物质均不干扰黄芩苷及内标物的测定,内标物与黄芩苷的保留时间分别为 11.8和 14.3 min,二者的分离度符合规定,说明本方法具有较高的专属性。



A为空白血浆,B为空白血浆+黄芩苷标准液(8.0 mg·L⁻¹)+内标液,C为给药后 5 h血浆;D为空白房水,E为空白房水+黄芩苷标准液(0.25 mg·L⁻¹)+内标液,F为给药后 0.5 h房水
1为内标(t_r = 11.8 min);2为黄芩苷(t_r = 14.3 min)

图 1 测定房水和血浆中黄芩苷浓度的典型 HPLC图

3.4 标准曲线制备 精密量取空白血浆 200 μL, 分别加入黄芩苷标准系列溶液配制成浓度相当于 0.012 5, 0.125, 0.5, 2.0, 8.0, 16.0 和 24.0 mg·L⁻¹ 的血浆样品, 按血浆样品的处理方法操作, 进样分析。以血浆中黄芩苷峰面积/内标峰面积 (Y) 对黄芩苷浓度 (X, mg·L⁻¹) 进行线性回归, 得回归方程 $Y = 0.476X + 0.1737$, $r = 0.9982$ 。本方法在 0.012 5 ~ 24.0 mg·L⁻¹ 内线性关系良好, 黄芩苷在血液中的最低定量浓度为 12.5 μg·L⁻¹。

精密量取空白房水 100 μL, 分别加入黄芩苷标准系列溶液配制成浓度相当于 0.02, 0.03, 0.04, 0.062 5, 0.125, 0.187 5 和 0.25 mg·L⁻¹ 的房水样品, 按房水样品的处理方法操作, 进样分析。以房水中黄芩苷峰面积/内标峰面积 (Y) 对黄芩苷浓度 (X,

mg·L⁻¹) 进行线性回归, 得回归方程 $Y = 0.5419X - 0.0035$, $r = 0.9968$ 。本方法在 0.02 ~ 0.25 mg·L⁻¹ 内线性关系良好, 黄芩苷在房水中的最低定量浓度为 20 μg·L⁻¹。

3.5 准确度与精密度考察 分别配制 0.125, 2.0, 16.0 μg·L⁻¹ 3 个质量浓度的黄芩苷标准血浆样品和 0.04, 0.125, 0.25 μg·L⁻¹ 3 个质量浓度的黄芩苷标准房水样品, 按“3.2 项操作并进行分析, 求得黄芩苷在血浆和房水中的回收率。在同一天和 5 d 间 (每天 1 批) 对以上 3 个质量浓度的黄芩苷标准血浆和房水样品分别处理 5 批后进样分析, 计算日内和日间精密度 (RSD), 结果见表 1。可见, 该法各项指标均符合生物样品分析指导原则的要求。

表 1 房水和血浆中黄芩苷的准确度和精密度试验结果

$n = 5, \bar{x} \pm s$

房 水					血 浆				
加入浓度 /mg·L ⁻¹	测得浓度 /mg·L ⁻¹	回收率 /%	日内 RSD /%	日间 RSD /%	加入浓度 /mg·L ⁻¹	测得浓度 /mg·L ⁻¹	回收率 /%	日内 RSD /%	日间 RSD /%
0.04	0.041	101.8 ± 7.4	7.25	6.18	0.125	0.122	98.4 ± 5.9	5.97	6.31
0.125	0.124	99.6 ± 3.1	3.10	3.58	2.0	0.197	99.1 ± 4.5	4.54	4.93
0.25	0.255	102.1 ± 1.9	1.91	2.19	16.0	15.67	97.5 ± 1.2	1.20	1.26

3.6 稳定性考察 取给药后 0.25 h 血浆和给药后 0.5 h 房水经 -20 °C 冰箱放置 10 d, 分别在放置 0, 1, 2, 4, 8 和 10 d 时测定样品中黄芩苷浓度, 计算 RSD 分别为 3.6% 和 9.5%; 取同样的 2 种样品经 -20 °C 冷冻-融化循环 3 次, 分别测定每次样品融化后的黄芩苷含量, 计算 3 次的 RSD 值分别为 2.5% 和 6.0%; 取给药后 0.167 h 血浆样品和给药后 0.75 h 房水样品, 在室温下流动相中放置 12 h, 分别在放置 0, 2, 4, 8 和 12 h 测定黄芩苷的浓度, 计算各时间点峰面积的 RSD 值分别为 0.9% 和 0.8%。3 项实验中 RSD 均 < 10%, 表明黄芩苷在血浆和房水中均无明显降解, 室温条件下在流动相中至少可稳定 12 h。

药动学参数的计算

黄芩苷灌胃给药后, 用 HPLC 法计算不同时间白兔房水和血浆中的药物浓度, 绘制药时曲线。采用 3p87 药动学软件计算黄芩苷在房水和血浆中的部分药动学参数, 用梯形法求算药时曲线下面积。

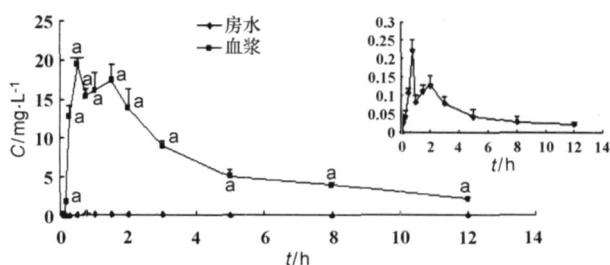
结 果

1 白兔房水和血浆中不同时间点的黄芩苷浓度测定

白兔单剂量灌胃黄芩苷 80 mg·kg⁻¹, 白兔房水和血液中的不同时间点的药物浓度见表 2, 药时曲线见图 2, 可见在给药后各个时间点黄芩苷在房水中的质量浓度均显著低于其血浆中的质量浓度 ($P < 0.01$)。

表 2 白兔单剂量灌胃黄芩苷 80 mg·kg⁻¹ 后房水和血浆中不同时间点的黄芩苷浓度比较

取样时间/h	房水 (n=8) /mg·L ⁻¹	血浆 (n=4) /mg·L ⁻¹	P
0.083	0	0.078 ± 0.031	< 0.01
0.167	0.026 ± 0.011	1.71 ± 0.42	< 0.01
0.25	0.041 ± 0.019	12.74 ± 1.44	< 0.01
0.5	0.106 ± 0.011	19.33 ± 0.90	< 0.01
0.75	0.221 ± 0.030	15.26 ± 0.99	< 0.01
1	0.082 ± 0.016	16.10 ± 2.22	< 0.01
1.5	0.111 ± 0.017	17.34 ± 2.00	< 0.01
2	0.129 ± 0.025	13.78 ± 2.37	< 0.01
3	0.077 ± 0.020	8.98 ± 0.60	< 0.01
5	0.042 ± 0.020	5.01 ± 0.85	< 0.01
8	0.030 ± 0.014	3.98 ± 0.29	< 0.01
12	0.020 ± 0.010	2.11 ± 0.23	< 0.01



与房水比较, $a: P < 0.01$

图 2 黄芩苷单剂量灌胃 80 mg·kg⁻¹ 后在兔血浆 (n=4) 和房水 (n=8) 中的药时曲线

2 黄芩苷在白兔房水和血浆中的部分药动学参数比较

黄芩苷在房水和血浆中的部分药动学参数,见表 3。黄芩苷在房水中的 AUC 值显著低于血浆中的 AUC 值,黄芩苷由中央室分布进入周边室(房水)的吸收速率常数(K)和消除速率常数(K)均极显著低于相应吸收进入体循环的常数,可见黄芩苷经灌胃后较难透过血房水屏障进入房水。

表 3 黄芩苷单剂量灌胃 80 mg·kg⁻¹后在兔血浆和房水中的部分药动学参数

参数	房水 (n=8)	血浆 (n=4)
K /h ⁻¹	0.591 ±0.062 ^a	111.2 ±1.9
K /h ⁻¹	0.013 ±0.001 ^a	0.15 ±0.01
$t_{1/2}$ /h	1.174 ±0.069 ^a	0.006 ±0.001
AUC _{0-12h} /h·mg·L ⁻¹	0.639 ±0.067 ^a	80.1 ±2.1
CL /mL·h ⁻¹	0.002 63 ±0.000 31 ^a	26.35 ±0.87
$t_{1/2}$ /h	52.79 ±0.07 ^a	4.63 ±0.28

与血浆比较, a: $P < 0.01$

讨 论

本实验应用 HPLC 法对兔灌胃后血浆和房水中黄芩苷质量浓度进行测定。由于黄芩苷为弱酸性药物且极性较大,所以本实验在流动相中加入磷酸抑制其解离,防止色谱峰拖尾,从而改善峰形。在采用的色谱条件下,用对二甲氨基苯甲醛作为内标物,内标与黄芩苷的保留时间相近,分离度符合规定,且血浆中内源性物质不干扰二者的测定,取得了很好的效果。本次实验应用乙腈取代甲醇作为蛋白沉淀剂,提高了黄芩苷的回收率。黄芩苷在血浆和房水中最低定量浓度分别为 12.5 和 20 μg·L⁻¹。说明本实验建立的 HPLC 法可以灵敏、特异、准确地测定房水和血浆中黄芩苷的质量浓度。

血房水屏障由睫状体无色素上皮的紧密连接、虹膜组织的连接和虹膜血管组成,就像一张微孔半径 105 μm 的半透性膜^[11]。脂溶性物质,如氧和二氧化碳可高速率通过屏障,大的水溶性离子、蛋白质和其他大、中分子物质则受到限制,不易通过屏障^[12],药物能否到达房水取决于其能否通过血房水屏障。本实验通过比较兔灌胃后各个时间点血浆和房水中药物的质量浓度发现,房水中的药物浓度远远低于血浆中的药物浓度,说明黄芩苷灌胃给药很难进入眼内,同时也证明了血房水屏障的存在。图 2 中显示黄芩苷在血浆和房水中的药时曲线均呈

现双峰形态,可能与黄芩苷在体内的生物转化有关。黄芩苷由于极性大灌胃给药后不能直接吸收入血,在肠道菌群 B2 葡萄糖醛酸苷酶作用下转化为苷元黄芩素,黄芩素在小肠黏膜中的 UDPG2 葡萄糖醛酸转移酶作用下转化为黄芩苷后部分吸收入血,部分又被黏膜细胞中的 MRP2 蛋白排出肠腔;还有一部分黄芩素直接吸收入血后被肝微粒体转化为黄芩苷及其他代谢物^[13]。这可能是药时曲线呈现双峰状态的原因,但仍需验证。

本实验为黄芩苷在房水内的药动学研究提供了可靠的分析测试方法,并为全身用药治疗眼内疾病提供了实验依据。如何提高药物的血房水屏障通透性仍值得深入研究。

[作者简介] 侯勇生(1974-),男,博士,主治医师,主要从事眼科临床研究。联系电话:13019016123, E-mail: houyush@126.com.

[参 考 文 献]

- [1] 李彤彤,李宏,侯茂君.黄芩化学成分及黄芩苷提取方法研究进展[J].天津药学,2002,14(3):7-8
- [2] 张建春,张华,施璇.黄芩苷的研究近况[J].时珍国医国药,2005,16(3):247-249.
- [3] 崔凤,袁静,王平全.黄芩苷药理作用研究进展[J].中国医院药学杂志,2000,20(11):685-686
- [4] UENG YF, SHYU CC, LN YL, et al Effects of baicalin and wogonin on drug-metabolizing enzymes in C57BL/6J mice[J]. Life Sci, 2000, 67(18): 2189-2200.
- [5] 高雷,陈鸿珊.黄芩苷体外对流感病毒、单纯疱疹病毒和柯萨奇病毒的抑制作用[J].中国新药杂志,2008,17(6):474-478
- [6] L U IX, DURHAM DG, RICHARDS RM. Baicalin synergy with beta-lactam antibiotics against methicillin-resistant Staphylococcus aureus and other beta-lactam-resistant strains of S aureus [J]. J Pharm Pharmacol, 2000, 52(3): 361-366.
- [7] 朱英.国内黄芩苷的研究根据[J].中国中西医结合杂志,1993,13(9):567-569.
- [8] NAGAKI Y, HA YASAKA S, ZHANG XY, et al Effects of topical instillation of traditional herbal medicines, herbal extracts, and their components on prostaglandin E2-induced aqueous flare elevation in pigmented rabbits[J]. Jpn J Ophthalmol, 2003, 47(3): 249-253.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部.北京:化学工业出版社,2005:211-212
- [10] 仇峰,何仲贵,程杉.RP-HPLC法测定兔血浆中黄芩苷含量[J].沈阳药科大学学报,2002,19(3):189-191.
- [11] 葛坚.眼科学[M].北京:人民卫生出版社,2002:26
- [12] 刘家琦,李凤鸣.实用眼科学[M].第2版.北京:人民卫生出版社,2003:44.
- [13] 车庆明,杨琳,陈颖,等.不同剂量黄芩素在大鼠体内的药动学差异[J].中国新药杂志,2007,16(8):604-606

编辑:朱振家 接受日期:2008-04-15