

# 黄芩苷磷脂复合物抗炎时效初步研究

陈忻,张楠,董晓丹,赵晖,刘玮(首都医科大学中医药学院中药药理室,北京 100069)

**摘要:**目的 比较黄芩苷、黄芩苷磷脂复合物的抗炎时效关系。方法 制备黄芩苷磷脂复合物;用二甲苯致小鼠腹部皮肤毛细血管通透性亢进炎症模型和耳肿模型;分光光度法测定腹部蓝染皮肤伊文思蓝渗出量。结果 抗炎时效曲线显示黄芩苷磷脂复合物组小鼠腹部皮肤伊文思蓝的渗出量在 0.5 h 即与对照组有显著差异,而黄芩苷则发生在 1 h 左右。磷脂复合物组 3 h 抗炎作用达到最强,21 h 内均呈现出明显的抗炎作用。而黄芩苷组在 4 h 时抗炎作用最大,之后抗炎作用下降,16 h 后已无作用。黄芩苷组与黄芩苷磷脂复合物组在给药后 2 h 抗炎作用已经表现出显著的差异,磷脂复合物组强于黄芩苷组。结论 黄芩苷磷脂复合物的抗炎活性明显强于黄芩苷,且作用出现更迅速、维持时间更久。

**关键词:**黄芩苷;黄芩苷磷脂复合物;时效关系;药动学;中药药理

中图分类号:R931.6;R965.1 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2007)05-0359-04

## Study on the Time-Effect Relationship of Phytosomes of Baicalin in Anti-inflammatory Effect

CHEN Xin,ZHANG Nan,DONG Xiao-dan,ZHAO Hui,LIU Wei( College of Traditional Chinese Medicine, Capital University of Medical Sciences,Beijing 100013,China)

**ABSTRACT:OBJECTIVE** To compare the time-effect relationship of Baicalin and Phytosomes of Baicalin in anti-inflammatory effect. **METHODS** The Phytosomes of Baicalin was prepared. The inflammation model of sthenic capillary vessel permeability was induced by xylene on venter skin of the mouse, and the model of otic swelling was induced by xylene on the mouse, respectively. The effusion quantity of the E. wliwas of blue skin was measured by spectrophotography. **RESULTS** The anti-inflammation time-effect curve showed that the effusion amount of the E. wliwas from mouse's venter skin in Phytosomes of Baicalin's group had statistical difference in 0.5h comparing with that of control group. However, This is occured after 1h in Baicalin group. Phytosomes of Baicalin reached the most anti-inflammatory effect at 3h, and kept the clearly effect within 21h. However, Baicalin reached the most anti-inflammatory effect at 4h, and then reduced, the effect was disappeared after 16h. Compared with the Baicalin, Phytosomes of Baicalin had statistical difference by orally administrated at 2h. **CONCLUSION** Compared to Baicalin, Phytosomes of Baicalin had stronger anti-inflammation effect which appeared faster and kept longer.

作者简介:陈忻,女,教授 Tel:(010)83911635 E-mail:chenxin4283@126.com

黄芩清热燥湿,泻火解毒,止血安胎。临床主要用于治疗上呼吸道感染、泌尿系统感染、菌痢、肝炎、高血压等。黄酮类化合物黄芩苷为其主要有效成分。药理研究已证明,黄芩苷有抑菌、清热、降压、镇静、利尿、利胆、抗炎、抗变态反应等活性<sup>[1]</sup>。以往和近期的研究都证明黄芩苷口服吸收率比较低,仅有4%~5%<sup>[2-3]</sup>,这与它的理化性质有关。吴建梅等<sup>[4]</sup>的研究证明黄芩苷与磷脂形成复合物后可显著促进黄芩苷的胃肠道吸收。本实验通过研究对比黄芩苷及其黄芩苷磷脂复合物抗炎作用的时效关系,以期对黄芩苷磷脂复合物的生物活性及时效关系获得更多的研究数据。为黄芩苷磷脂复合物的进一步开发提供依据。

1 试验材料与方法

1.1 动物

ICR 小鼠,雌雄不限,318 只,由首都医科大学动物中心提供。合格证号:scxkc(京)72000-0012。

1.2 药品

黄芩苷精制品:四川广汉市本草植化有限公司产品;经紫外光谱鉴别,与其对照品(中国药品生物制品检定所,批号 0715-9909)特征基本一致,测定其平均含量基本接近 100%;大豆磷脂:北京化学试剂公司产品。

2 实验方法

2.1 黄芩苷磷脂复合物的制备及检验

2.1.1 黄芩苷磷脂复合物的制备及其结合率的测定 参照吴建梅等<sup>[5]</sup>的研究,利用黄芩苷不溶于氯仿,而磷脂和黄芩苷磷脂复合物均易溶于氯仿的特性,室温下将黄芩苷和大豆磷脂以 1:3.5,投入四氢呋喃中,药物反应浓度为 10 mg·mL<sup>-1</sup>,磁力搅拌 1 h 后,减压除去反应溶剂,再加入适量的氯仿,充分溶解其中的磷脂及复合物,去除上清液,再用少量氯仿洗涤,收集沉淀,干燥并称重。黄芩苷的初始投药量与沉淀量的差值即为与磷脂复合的黄芩苷的量,从而计算出黄芩苷与磷脂的结合百分率。我室制备的黄芩苷磷脂复合物实验测得结合率为 96.99%。

2.1.2 黄芩苷磷脂复合物中黄芩苷的回收率测定 精密称取黄芩苷对照品适量,配成 300 μg·mL<sup>-1</sup>的甲醇溶液,从中取出 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8 mL 于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,得到浓度为 3,6,9,12,15,18,24 μg·mL<sup>-1</sup>的系列标准溶液,以空白甲醇为对照于 320 nm 下测定其吸光度,以吸光度对浓度做线性回归,所得方程为  $A = 36.364C - 1.990, r = 0.9976 (n = 3)$ 。分别精密称取相当于 10 mg 黄芩苷的黄芩苷磷脂复合物于 50 mL 量瓶中,甲醇定容,从中取出 0.6 mL 于 10 mL 量瓶中,以甲醇稀释至刻度,配制相应的磷脂溶液为对照,于 320 nm 下进行测定,其吸光度为 0.323,则测得的黄芩苷磷脂复合物中黄芩苷的量为 97.56%。

2.2 药效实验<sup>[6]</sup>

2.2.1 小鼠皮肤毛细血管通透性亢进实验 小鼠 198 只腹

部去毛,随机分成黄芩苷组(H)、黄芩苷磷脂复合物组(HL)及对照组(M)三大组,每组按时间点分为 0.5,1,2,3,4,7,10,13,16,19,21 h 共 11 个小组,每组 8 只。H 组和 HL 组均按 100 mg·kg<sup>-1</sup>黄芩苷的剂量,口服灌胃给药,对照组给生理盐水。各组在各时间点上给小鼠尾静脉注射 0.5% 伊文思蓝(0.01 mL·g<sup>-1</sup>体重)后,立即腹部滴加二甲苯 0.02 mL/只,20 min 后小鼠脱颈椎致死,剥下腹部皮肤,蓝染的皮肤斑用手术剪剪碎置试管中,加入丙酮-水混合溶液(丙酮与水的比例为 7:3)5 mL 浸泡,摇匀,2 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取上清液于 590 nm 比色测定吸光度。根据伊文思蓝标准曲线(标准曲线:由 20 μg·mL<sup>-1</sup>伊文思蓝丙酮-水混合溶液,稀释成浓度为 1,3,5,7,9,11,13,15,17,19 μg·mL<sup>-1</sup>的系列标准溶液,于 590 nm 测定其吸光度,所得标准曲线线性回归方程为  $C = 0.0913A - 0.0086, r = 0.9995$ )测知小鼠腹部皮肤伊文思蓝渗出量,以此反映小鼠毛细血管通透性的变化以观察药物的抗炎作用。

2.2.2 二甲苯致小鼠耳廓肿胀炎症实验 小鼠 120 只,随机分成黄芩苷组(H)、黄芩苷磷脂复合物组(HL)及对照组(M)三大组,每组按时间点分为 1,3,5,7,11,15 h 共 6 个小组,每组 8 只。H 组和 HL 组均按 100 mg·kg<sup>-1</sup>黄芩苷的剂量,口服灌胃给药,对照组给生理盐水。各组在各时间点到达前 40 min 给小鼠左耳滴加 100 μL 二甲苯,各时间点到达时,处死动物并用打孔器取小鼠两耳的耳片,以右耳与左耳的重量差(肿胀度)为指标观察药物的抗炎作用。

3 实验结果

3.1 黄芩苷磷脂复合物对小鼠腹部皮肤伊文思蓝的渗出量的影响及时效关系

各大组不同时间组小鼠腹部皮肤伊文思蓝的渗出量结果见表 1。

表 1 小鼠腹部皮肤伊文思蓝渗出量(n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 The effusion amount of E. wliwas from mouse's venter skin(n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

| 时间/h | H/μg·mL <sup>-1</sup>         | HL/μg·mL <sup>-1</sup>          | M/μg·mL <sup>-1</sup> |
|------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| 0.5  | 0.0324 ± 0.0019               | 0.0295 ± 0.0029 <sup>1)</sup>   | 0.0350 ± 0.0019       |
| 1    | 0.0169 ± 0.0047 <sup>1)</sup> | 0.0145 ± 0.0027 <sup>1)</sup>   | 0.0299 ± 0.0016       |
| 2    | 0.0255 ± 0.0029 <sup>1)</sup> | 0.0174 ± 0.0034 <sup>1,2)</sup> | 0.0391 ± 0.0015       |
| 3    | 0.0192 ± 0.0032 <sup>1)</sup> | 0.0117 ± 0.0039 <sup>1,2)</sup> | 0.0391 ± 0.0012       |
| 4    | 0.0166 ± 0.0049 <sup>1)</sup> | 0.0196 ± 0.0023 <sup>1)</sup>   | 0.0349 ± 0.0014       |
| 7    | 0.0333 ± 0.0022 <sup>1)</sup> | 0.0191 ± 0.0020 <sup>1,3)</sup> | 0.0567 ± 0.0037       |
| 10   | 0.0697 ± 0.0057               | 0.0241 ± 0.0025 <sup>1,3)</sup> | 0.0676 ± 0.0040       |
| 13   | 0.0765 ± 0.0038 <sup>1)</sup> | 0.0306 ± 0.0018 <sup>1,3)</sup> | 0.0658 ± 0.0012       |
| 16   | 0.0755 ± 0.0048               | 0.0549 ± 0.0038 <sup>1,3)</sup> | 0.0802 ± 0.0021       |
| 19   | 0.0760 ± 0.0039               | 0.0654 ± 0.0041 <sup>1,3)</sup> | 0.0799 ± 0.0026       |
| 21   | 0.0805 ± 0.0015               | 0.0728 ± 0.0013 <sup>1,3)</sup> | 0.0816 ± 0.0006       |

注:与 M 组比较,<sup>1)</sup>P<0.01;H 与 HL 比较,<sup>2)</sup>P<0.05,<sup>3)</sup>P<0.01  
Note: Compare with M group,<sup>1)</sup>P<0.01; H group compare with HL group,<sup>2)</sup>P<0.05,<sup>3)</sup>P<0.01

3.2 黄芩苷磷脂复合物对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响及时效关系

各大组不同时间组小鼠抗炎作用结果见表2。

表2 黄芩苷磷脂复合物抑制二甲苯致小鼠耳廓肿胀的时效关系( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

Tab 2 The Time-Effect Relationship of Phytosomes of Baicalin in inhibiting otic swelling induced by xylene on the mouse( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

| 组别     | H/mg                        | HL/mg                       |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 h 组  | 7.270 ± 3.069               | 5.986 ± 3.095 <sup>1)</sup> |
| 3 h 组  | 4.043 ± 2.306 <sup>2)</sup> | 6.617 ± 3.644 <sup>1)</sup> |
| 5 h 组  | 4.088 ± 2.699 <sup>3)</sup> | 7.013 ± 3.255 <sup>1)</sup> |
| 7 h 组  | 6.675 ± 2.166 <sup>1)</sup> | 7.150 ± 3.245 <sup>1)</sup> |
| 11 h 组 | 7.614 ± 2.545               | 5.671 ± 2.879 <sup>1)</sup> |
| 15 h 组 | 9.738 ± 3.551               | 4.750 ± 2.047 <sup>3)</sup> |

注:与正常对照组( $10.167 \pm 2.986$ )比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.001$

Note: Compared with normal group( $10.167 \pm 2.986$ ),<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.001$

3.3 黄芩苷磷脂复合物抗炎时效关系特点

如表1所示,黄芩苷磷脂复合物组小鼠腹部皮肤伊文思蓝的渗出量在0.5 h即与对照组有显著差异,而黄芩苷则发生在1 h左右。黄芩苷磷脂复合物组给药后3 h抗炎作用达到最强,在实验进行的21 h内均呈现出明显的抗炎作用,21 h仍与对照组有显著性差异。黄芩苷组的伊文思蓝渗出量在4 h时达到最小值,即抗炎作用最大,之后抗炎作用下降,16 h后已无作用。此外,黄芩苷组与黄芩苷磷脂复合物组在给药后2 h抗炎作用已经表现出显著的差异,磷脂复合物组强于黄芩苷组。表2显示黄芩苷磷脂复合物显著对抗二甲苯致小鼠耳廓肿胀炎症反应,时效关系也显示磷脂复合物抗炎作用出现早,作用平稳,维持时间较长。

4 讨论

从黄芩苷分子结构看,具有COOH基团,为弱酸性,在酸性条件下呈分子状态<sup>[7]</sup>;大鼠离体胃吸收实验表明在酸性下吸收百分率最大,离体小肠吸收速率常数随pH增大而减少,胃肠吸收行为符合pH分配学说<sup>[8]</sup>。黄芩苷口服吸收率比较低的原因:一是与它水溶性、脂溶性均不佳有关<sup>[7]</sup>;二是黄芩苷的弱酸性使它由胃排入肠道后,随肠道pH的升高吸收降低<sup>[8]</sup>。再有黄芩苷口服给药表现出的药动学与静脉给药差距非常明显,静脉给药代谢消除较快,消除速度常数 $\beta$ 一般为0.3 h<sup>-1</sup>左右,维持有效血药浓度的时间也较短, $t_{1/2}$ 为0.16 h左右,而口服给药代谢速率较静脉途径慢,生物半衰期也较长<sup>[3]</sup>。如主要含黄芩苷的制剂给大鼠口服,其中黄芩苷的代谢半衰期为9.54 h<sup>[2]</sup>;还有报道黄芩苷口服吸收后完全从体内消除需36h以上<sup>[9]</sup>。分析这些资料可以认为改善黄芩苷的口服吸收,维持有效血药浓度从而维持有效作用时间对提高其生物有效性是很有意义的。我们进行的时效关

系研究发现单次口服给药,在小鼠皮肤毛细血管通透性亢进实验中,黄芩苷磷脂复合物较黄芩苷抗炎作用增强,作用出现早且维持时间更长,有更好的生物有效性。并且显著对抗二甲苯致小鼠耳廓肿胀炎症反应,时效关系也显示相似的特性,即磷脂复合物作用出现早,作用平稳,维持时间较长。显然维持时间较长是黄芩苷磷脂复合物时效关系呈现的突出特点。

磷脂复合物(phytosome)的有关研究自意大利学者发表专利以来相继展开,近年来许多国外文献报道,将天然活性成分与磷脂在一定条件下进行复合,得到的天然活性成分磷脂复合物其理化性质和生物特性较原化合物均有不同程度的改变,具有较强的亲脂性<sup>[10]</sup>。通过与磷脂复合而形成载体系统或前体药物,可有效地提高天然活性成分的体内吸收,显著地改善其生物有效性<sup>[11]</sup>。我们的实验也证明这一点。分析黄芩苷磷脂复合物生物有效性提高的原因,可能一是药物与磷脂形成复合物后改变了黄芩苷的理化性质,使黄芩苷的脂溶性增大,增强了吸收;再者由于磷脂与细胞膜的高度亲和性,可促进黄芩苷分子与细胞膜结合而促进吸收。可能二是黄芩苷磷脂复合物释药延缓,代谢速度延缓,血药浓度平稳,生物有效性提高。关于黄芩苷与其磷脂复合物药动学的对比研究将有待于深入的工作。

作为载体的磷脂广泛分布于自然界、安全无不良反应、分子简单、能增强药物活性。作为一种新的有潜力的给药系统,天然活性成分的磷脂复合物有着很好的研究和应用前景,将开辟我国天然药物及中药新药的开发新途径,对加速传统中药制剂的现代化进程,提高中药临床应用质量,都将具有重要的理论和实际意义。

REFERENCES

[1] ZHANG X P, TIAN H, CHENG Q H. The current situation in pharmacological study on baicalin[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2003, 19(11): 1212-1215.

[2] ZHANG Z R, Hu X Y, Jiang D Y et al. Metabolic kinetic study on Baicalin of Yinhuang Granules( Flos Lonicerae, Radix Scutellariae, etc. ) in rabbit body[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 1996, 8(6): 1-3.

[3] ZHAOY N, SHI Y, XING D M et al. Pharmacokinetic Parameters of Baicaline in YL-2000 in normal rats[J]. China J Basic Med Tradit Chin Med(中国中医基础医学杂志), 2002, 8(9): 59-60.

[4] WU J M, CHEN D W, ZHANG R H. Smdy on he bioavailability of baicalin phosopholipid complex by using HPLC[J]. Biomed Chromatogr, 1999, 13(7): 493.

[5] WU J M, CHEN D W, LIU Y L. Study on the Preparation of Baicalin Complex with Phospholipid[J]. China J Chin Mat Med(中国中药杂志), 2001, 26(3): 166-169.

[6] CHEN Q. Methodology of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine(中药药理研究方法学)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993: 303-305.

[7] WANG H, CHEN J M, ZHANG Q M. Determination of the physi-

- cal chemistry constants of Baicalin[J]. J Shenyang Pharm Uni(沈阳药科大学学报), 2000, 17(2): 105-106.
- [8] WANG H, CHEN J M, ZHANG Q M. A Study on the Absorption Kinetics of Baicalin in Rats' Stomachs and Small Intestines *in vitro*[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University(沈阳药科大学学报), 2000, 17(1): 5-7.
- [9] MUTO R, MOTOZUKA T, NAKANO M, et al. The chemical structure of new substance as the metabolite of baicalin and time profiles for the plasma concentration after oral administration of shosaiko-to in human[J]. Yakugaku Zasshi, 1998, 118(3): 79-87.
- [10] WU J M, CHEN D W, SUN B. General Introduction on Pharmacy Research of Phytosomes[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 1998, 33(1): 9-11.
- [11] LIU C, XIE W, YU F. Phytosomes- $\alpha$ -diammonium glycyrrhizate phosphatidylcholine complex[J]. Anti-infection Pharmacy(抗感染药学), 2004, 1(3): 97-109.

收稿日期: 2006-11-25