

芪雪浸膏剂中大黄素、大黄酸和毛蕊异黄酮在大鼠体内的药动学研究^Δ

吴磊*, 居文政, 戴国梁, 陆超[#](南京中医药大学附属医院/江苏省中医院临床药理实验室, 南京 210029)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)21-2935-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.21.13

摘要 目的:建立大鼠血浆中大黄素、大黄酸和毛蕊异黄酮含量的测定方法,并研究大鼠体内芪雪浸膏剂的药动学。方法:采用液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)法。色谱柱为Thermo C₁₈,流动相为乙腈-0.1%甲酸溶液(梯度洗脱),流速为0.2 mL/min,柱温为30 ℃,进样量为20 μL,定量离子为大黄素质荷比(*m/z*)269.7→226.1,大黄酸*m/z* 283.7→239.9,毛蕊异黄酮*m/z* 283.5→268.5,地西洋(内标物)*m/z* 285.0→154.1。6只大鼠灌胃芪雪浸膏剂8.91 g/kg(按临床用量换算而得)后0.08、0.17、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、12 h眼眶取血测定血药浓度。采用DAS 1.0药动学软件计算各药动学参数。结果:大黄素、大黄酸和毛蕊异黄酮质量浓度线性范围分别为1.988~198.8 ng/mL(*r*=0.998 8)、2~200 ng/mL(*r*=0.998 8)、2.092~209.2 ng/mL(*r*=0.998 5),精密度、准确度试验的RSD均小于7.78%(*n*=5),基质效应分别为92.13%~102.23%、90.15%~93.67%、90.33%~104.63%(*n*=5),稳定性试验的RSD均小于6.54%(*n*=3);3种成分在大鼠体内的 $t_{1/2}$ 分别为(1.95±0.53)、(3.55±1.25)、(4.21±1.14) h, AUC_{0-12 h}分别为(192.67±40.58)、(93.67±20.26)、(608.41±108.36) μg·h/L, c_{max} 分别为(89.56±12.87)、(31.84±10.58)、(300.56±50.57) μg/L, t_{max} 分别为(0.50±0.00)、(0.75±0.23)、(1.00±0.00) h, CL分别为(5.45±1.12)、(2.09±0.47)、(10.01±1.25) L/(h·kg)(*n*=6)。结论:建立的方法灵敏度高、准确可靠,大黄素、大黄酸、毛蕊异黄酮在大鼠体内的消除过程为一级消除,且符合二室开放模型。

关键词 芪雪浸膏剂;大黄素;大黄酸;毛蕊异黄酮;药动学;液相色谱-质谱联用;大鼠

Study on Pharmacokinetics of Emodin, Rhein and Calycosin from Qixue Extract in Rats *in vivo*

WU Lei, JU Wenzheng, DAI Guoliang, LU Chao (Dept. of Clinical Pharmacology, the Affiliated Hospital of Nanjing University of TCM/Jiangsu Hospital of TCM, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of emodin, rhein and calycosin in rat plasma, and to study pharmacokinetics of Qixue extract in rats. METHODS: LC-MS/MS method was adopted. The determination was performed on Thermo C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid solution (gradient elution), and flow rate of 0.2 mL/min. The column temperature was set at 30 ℃, and sample size was 20 μL. The quantitative ions were emodin *m/z* 269.7→226.1, rhein *m/z* 283.7→239.9, calycosin *m/z* 283.5→268.5 and diazepam *m/z* 285.0→154.1. The blood concentration of samples from orbital cavity of 6 rats were determined 0.08, 0.17, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, 12 h after intragastric administration of Qixue extract 8.91 g/kg (by clinical dosage). DAS 1.0 pharmacokinetic software was employed to calculate pharmacokinetic parameters. RESULTS: The linear ranges of emodin, rhein and calycosin were 1.988-198.8 ng/mL (*r*=0.998 8), 2-200 ng/mL (*r*=0.998 8) and 2.092-209.2 ng/mL (*r*=0.998 5), respectively. RSDs of precision and accuracy tests were all less than 7.78% (*n*=5). The recoveries were 92.13%-102.23%, 90.15%-93.67% and 90.33%-104.63% (*n*=5), respectively. RSDs of stability tests were all less than 6.54% (*n*=3). The pharmacokinetic parameters of emodin, rhein and calycosin were as follows as $t_{1/2}$ were (1.95±0.53), (3.55±1.25), (4.21±1.14) h; AUC_{0-12 h} were (192.67±40.58), (93.67±20.26), (608.41±108.36) μg·h/L; c_{max} were (89.56±12.87), (31.84±10.58), (300.56±50.57) μg/L; t_{max} were (0.50±0.00), (0.75±0.23), (1.00±0.00) h; CL were (5.45±1.12), (2.09±0.47), (10.01±1.25) L/(h·kg) (*n*=6), respectively. CONCLUSIONS: Established method is highly sensitive, accurate and reliable. The elimination process of emodin, rhein and calycosin are first-order elimination, which is in line with two-compartment model.

KEYWORDS Qixue extract; Emodin; Rhein; Calycosin; Pharmacokinetics; LC-MS/MS; Rats

芪雪浸膏剂由黄芪、六月雪、当归、虎杖、土茯苓、怀牛膝等共11味饮片组成,为江苏省中医院孙伟教授首创

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81573685)

* 副主任中药师。研究方向:中药临床药动学。电话:025-86614204。E-mail: xiaoleiyaoshi@163.com

通信作者:副主任中药师。研究方向:中药临床药动学。电话:025-86529291。E-mail: sinkly228@126.com

“益肾清利活血方”(后规范命名为“芪雪浸膏剂”),用以治疗慢性肾脏病,具有清热活血、清利除湿、祛风通络、益肾清利、和络泄浊的功效;对代偿期与失代偿期的慢性肾功能衰竭患者具有稳定其肾功能的作用;对肾功能衰竭期及尿毒症晚期的患者可延缓其肾功能进行性恶化的速度^[1]。相关研究表明,该方可显著地降低蛋白尿^[2],

延缓慢性肾功能衰竭的进展^[3],长期坚持治疗可明显改善患者的生活质量^[4]。目前针对该方的研究多集中在临床应用方面^[5-7],未见药动学特性方面的相关报道。在前期研究中,笔者考察了芪雪浸膏剂中大黄素、大黄酸、毛蕊异黄酮、大黄素甲醚、金丝桃苷、黄芪甲苷等共9种成分的含量测定方法,但在进行体内预实验的时候发现,仅大黄素、大黄酸、毛蕊异黄酮这3种成分在大鼠血浆的含量较高。因此,本文建立液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)方法,考察了芪雪浸膏剂中大黄素、大黄酸和毛蕊异黄酮在大鼠体内的血药浓度和药动学参数,为芪雪方浸膏剂的临床应用提供实验支持。

1 材料

1.1 仪器

Thermo Fisher TSQ 质谱仪,包括电喷雾离子源、Xcalibur 1.4 工作站(美国 Thermo 公司);DionexU 超高效液相色谱系统(美国 Dionex 公司);BP-211D 电子分析天平(德国 Sartorius 公司);AR 2140 万分之一天平(上海奥豪斯仪器有限公司);VORTEX 多功能涡旋混合器(美国 Scientific 公司);5430R 冷冻高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.2 药品与试剂

黄芪(批号:15020201)、六月雪(批号:15070602)、当归(批号:14120301)、虎杖(批号:15050701)、土茯苓(批号:15062704)、怀牛膝(批号:15022801)均购自江苏省医药有限公司;大黄素对照品(批号:140410,纯度: $>98\%$)、大黄酸对照品(批号:140919,纯度: $>98\%$)、毛蕊异黄酮对照品(批号:140928,纯度: $>98\%$)均购自南京宁岐医药科技有限公司;地西洋(内标物,中国食品药品检定研究院,批号:171225-200903,纯度: $\geq 99\%$);乙腈、甲醇均为色谱纯;水为超纯水。

1.3 动物

SD 大鼠,SPF 级,♂,6 只,体质量 240~260 g,由南通大学比较医学中心提供,动物生产合格证号:SCXK-(苏)2014-0001。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Thermo C₁₈(100 mm×2.1 mm,1.9 μm);流动相:乙腈(A)-0.1% 甲酸溶液(B)梯度洗脱(0~1 min,25% A;1~5.5 min,25%→90% A;5.5~9 min,90% A;9~9.5 min,90%→25% A;9.5~13 min,25% A);流速:0.2 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。

2.1.2 质谱条件 离子源:电喷雾(ESI);检测模式:正负离子切换模式;扫描方式:多反应监测模式(MRM);喷雾电压:(+)4 000/(-)3 000 V;离子源温度:200 ℃;毛细管温度:270 ℃;鞘气(N₂)压力:20 Arb;辅助气(N₂)压力:5 Arb。定量离子为大黄素质荷比(m/z)269.7→226.1,大黄酸 m/z 283.7→239.9,毛蕊异黄酮 m/z 283.5→

268.5,地西洋 m/z 285.0→154.1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 取大黄素、大黄酸、毛蕊异黄酮对照品适量,用甲醇溶解,配制质量浓度分别为 0.994、56.8、1.046 mg/mL 的单一对照品贮备液。取上述 3 种单一对照品贮备液适量,加甲醇配制成每 1 mL 含大黄素 19.88 μg、大黄酸 20 μg、毛蕊异黄酮 20.92 μg 的混合对照品溶液。以上溶液均保存于 4 ℃ 冰箱。

2.2.2 内标溶液的配制 取地西洋对照品适量,精密称定,用甲醇溶解并稀释成 502.5 ng/mL 的内标溶液,于 4 ℃ 保存,备用。

2.2.3 芪雪浸膏剂的制备 取黄芪、当归、六月雪、虎杖、土茯苓、怀牛膝等 11 味饮片适量,加入 10 倍量水,加热回流提取 2 次,每次 40 min,合并提取液,滤过,滤液减压浓缩至稠膏状,干燥,粉碎,过 4 号筛,即得浸膏粉末(每 1 g 原药材相当于 0.6 g 浸膏粉末,分别含大黄素 31.17 μg、大黄酸 23.16 μg、毛蕊异黄酮 15.58 μg)。

2.3 血浆样品处理

取血浆样品 100 μL,加入甲醇 400 μL,涡旋振荡 5 min,离心(30 130×g,下同)5 min,取上清液于 40 ℃ 真空挥干,再加入 150 μL 甲醇复溶,涡旋振荡 5 min,离心 5 min,取上清液 20 μL,进样测定。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性 取空白血浆(不加内标)、单一对照品溶液(加 10 μL 内标)、灌胃给药 2 h 后大鼠血浆(加 10 μL 内标),按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下条件进样测定,记录色谱图。结果,大黄素、大黄酸、毛蕊异黄酮和地西洋互不干扰,峰形良好,且血浆中内源性物质也不干扰其测定,基线平稳。样品总离子图见图 1。

2.4.2 线性关系与定量下限 取空白血浆 100 μL,分别加入大黄素、大黄酸、毛蕊异黄酮混合对照品溶液各 10 μL,配制成大黄素血浆质量浓度为 1.988、4.97、9.94、19.88、49.7、99.4、198.8 ng/mL,大黄酸血浆质量浓度为 2.5、10、20、50、100、200 ng/mL,毛蕊异黄酮血浆质量浓度分别为 2.092、5.23、10.46、20.92、52.3、104.6、209.2 ng/mL 的模拟血浆样品。按“2.3”项下方法处理后,取 20 μL 按“2.1”项下条件进样测定。以各成分峰面积(y)对血浆质量浓度(x)进行线性回归,得大黄素回归方程为 $y=0.000\ 9x+0.003\ 3$ ($r=0.998\ 8$),线性范围为 1.988~198.8 ng/mL,定量下限为 1.988 ng/mL;大黄酸回归方程为 $y=0.000\ 7x+0.002\ 6$ ($r=0.998\ 8$),线性范围为 2~200 ng/mL,定量下限为 2 ng/mL;毛蕊异黄酮回归方程为 $y=0.001\ 8x-0.001\ 7$ ($r=0.998\ 5$),线性范围为 2.092~209.2 ng/mL,定量下限为 2.092 ng/mL。

2.4.3 精密度 取空白血浆 100 μL,按“2.4.2”项下方法制备低、中、高 3 个质量浓度(大黄素:1.988、19.88、198.8 ng/mL;大黄酸:2.20、200 ng/mL;毛蕊异黄酮:2.092、

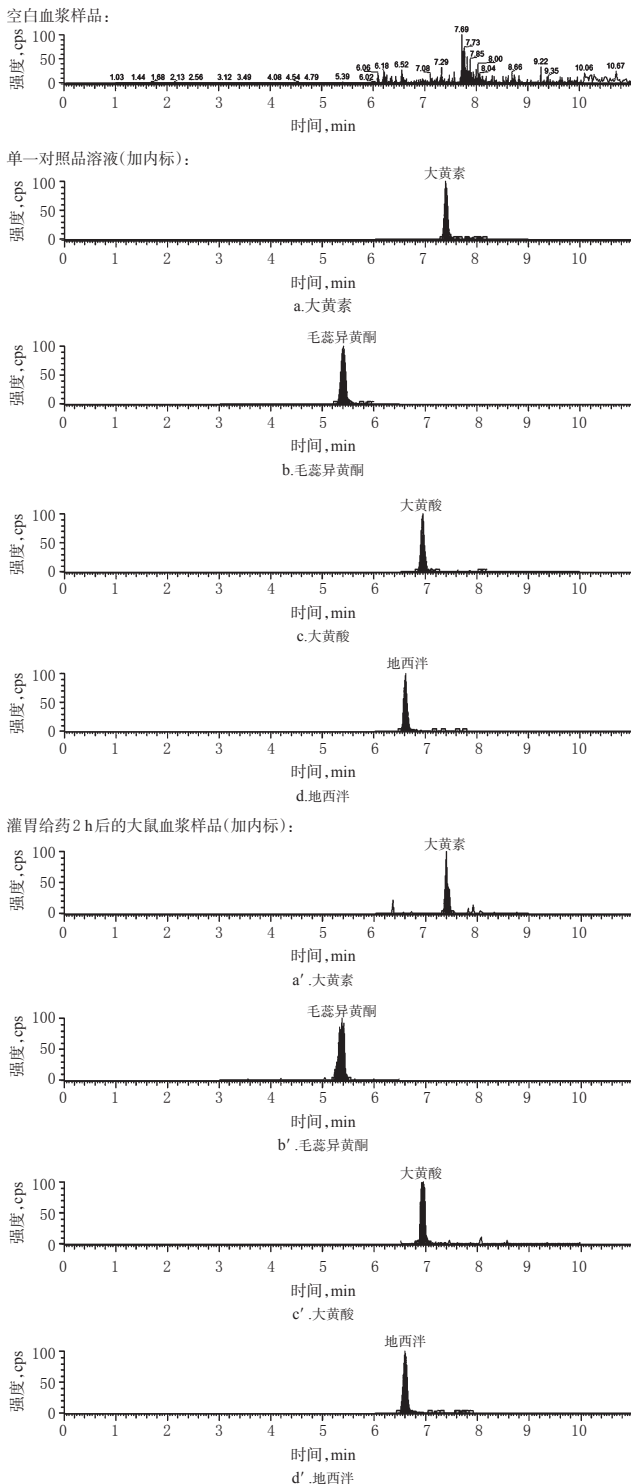


图1 样品总离子流图
Fig 1 TIC of samples

20.92、209.2 ng/mL)的血浆质控(QC)样品,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下条件进样测定,记录色谱图。每个质量浓度同日内连续测定5次,考察日内精密密度;另每天测定1次,连续测定3 d,考察日间精密密度。结果,大黄素、大黄酸、毛蕊异黄酮日内RSD分别为 $\leq 5.66\%$ 、 $\leq 4.71\%$ 、 $\leq 6.14\%$ ($n=5$);日间RSD分别为 $\leq 5.34\%$ 、 $\leq 5.07\%$ 、 $\leq 7.78\%$ ($n=3$)。

2.4.4 准确度 取空白血浆 100 μL ,按“2.4.3”项下方法制备低、中、高不同质量浓度的QC样品,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项条件进样测定,记录色谱图。以大黄素、大黄酸和毛蕊异黄酮峰面积计算的相应质量浓度与真实质量浓度的比值计算回收率。结果,大黄素、大黄酸和毛蕊异黄酮低、中、高3个质量浓度样品的回收率分别为大黄素 78.50%、84.67%、89.33%,大黄酸 81.43%、87.45%、94.82%,毛蕊异黄酮 82.51%、83.05%、94.33%,RSD 分别为 4.22%~5.20%、2.78%~3.97%、2.17%~4.38% ($n=5$)。

2.4.5 基质效应 取离心管数只,分别精密加入 10 μL 低、中、高3个质量浓度(大黄素质量浓度为 1.98、19.88、198.8 ng/mL,大黄酸质量浓度为 2、20、200 ng/mL,毛蕊异黄酮质量浓度为 2.092、20.92、209.2 ng/mL)混合对照品溶液,再加入 10 μL 内标及 80 μL 水,涡旋 30 s,离心 5 min,按“2.1”项下条件进样测定,记录峰面积 A 。另按“2.3”项下方法制备空白血浆数管,挥干后同上操作,记录峰面积 B 。基质效应公式为 $B/A \times 100\%$ 。结果,大黄素、大黄酸和毛蕊异黄酮血浆样品低、中、高3个质量浓度基质效应分别为大黄素 95.26%、92.13%、102.23%,大黄酸 93.67%、92.97%、90.15%,毛蕊异黄酮 96.80%、90.33%、104.63% ($n=5$)。

2.4.6 样品稳定性考察 取空白血浆 100 μL ,按“2.4.3”项下方法制备低、中、高3个不同质量浓度的QC样品,按“2.3”项下方法处理后,分别在室温(约 25 $^{\circ}\text{C}$)下放置 12 h、-20 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 3 次、-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存 10 d 后进行稳定性考察,每个质量浓度平行测定 3 份。结果,经处理后的QC样品室温放置 12 h 后,大黄素、大黄酸、毛蕊异黄酮的峰面积的RSD均 $< 6.49\%$ ($n=3$),经过-20 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 3 次后峰面积的RSD均 $< 6.54\%$ ($n=3$),经过-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存 10 d 后峰面积的RSD均 $< 6.11\%$ ($n=3$)。

2.5 药动力学实验

取SD大鼠6只,给药前12 h禁食不禁水,分别灌胃给予芪雪浸膏剂 8.91 g/kg(按临床用量换算而得),大鼠分别于给药前及给药后 0.08、0.17、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、12 h 眼眶取血约 0.3 mL,置于肝素化试管中,离心 10 min,取上层血浆。按照“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下条件进样测定。利用回归方程计算各峰面积对应的血药浓度,应用 DAS 1.0 分析得出主要药动力学参数。结果,大黄素、大黄酸、毛蕊异黄酮在大鼠体内的消除过程均属一级消除,符合二室开放模型。单剂量灌胃芪雪浸膏剂后大黄素、大黄酸、毛蕊异黄酮的药-时曲线见图 2,主要药动力学参数见表 1。

3 讨论

芪雪浸膏剂是根据我院孙伟教授首创的“益肾清活血方”制备而成,经肾内科 50 多年的临床经验积累、提炼,长期应用于临床,其相关的药理作用报道较多^[8-9],但

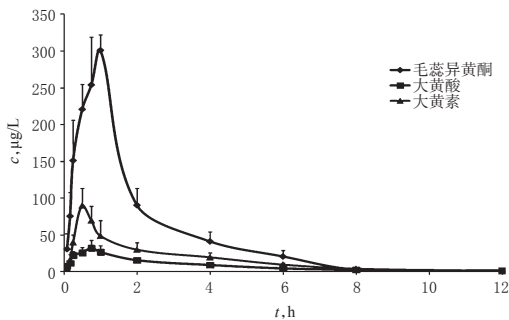


图2 大鼠体内大黄素、大黄酸和毛蕊异黄酮的药-时曲线

Fig 2 Plasma concentration-time curves for emodin, rhein and calycosin in rats

表1 大鼠灌胃芪雪浸膏剂后大黄素、大黄酸和毛蕊异黄酮的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of emodin, rhein and calycosin after rats intragastric administration of Qixue extract($\bar{x} \pm s, n=6$)

药动学参数	大黄素	大黄酸	毛蕊异黄酮
$t_{1/2}$, h	1.95 ± 0.53	3.55 ± 1.25	4.21 ± 1.14
V , L/kg	11.18 ± 2.14	2.87 ± 0.54	15.70 ± 3.58
CL, L/(h·kg)	5.45 ± 1.12	2.09 ± 0.47	10.01 ± 1.25
AUC_{0-12} , $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$	192.67 ± 40.58	93.67 ± 20.26	608.41 ± 108.36
$AUC_{0-\infty}$, $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$	195.19 ± 39.24	97.44 ± 22.33	610.56 ± 112.81
t_{max} , h	0.50 ± 0.00	0.75 ± 0.23	1.00 ± 0.00
C_{max} , $\mu\text{g}/\text{L}$	89.56 ± 12.87	31.84 ± 10.58	300.56 ± 50.57

是方中潜在活性成分包括大黄素甲醚、大黄素、毛蕊异黄酮、大黄酸、槲皮素、杨梅素、虎杖苷、金丝桃苷、黄芪甲苷等在人体内的药动学特征尚不清楚^[10-12]。根据预试验结果,笔者选择大黄素、大黄酸、毛蕊异黄酮对芪雪浸膏剂在大鼠体内的药动学特征进行了初步考察。试验前考察了血浆样品中待测成分的提取方法,比较了甲醇沉淀法、乙腈沉淀法、乙酸乙酯萃取法、正丁醇萃取法对回收率的影响^[10,13],结果发现,甲醇沉淀法回收率高,无内源性物质干扰,样品峰形较好,故选择甲醇沉淀法作为血浆前处理的方法。本试验选择地西洋作为内标物质^[14],其与待测物质大黄素、大黄酸、毛蕊异黄酮保留时间适宜,峰形良好,无内源性杂质干扰。试验建立了大鼠血浆中上述成分同步定量的LC-MS/MS法,结果表明,所建立的方法迅速、准确、稳定、可靠,可以满足生物样本中的定量要求。

药动学研究结果表明,大黄素、大黄酸、毛蕊异黄酮均可被快速吸收入血,大鼠灌胃芪雪浸膏剂后5 min即可被检测到,大黄素达峰时间在0.5 h左右,大黄酸达峰时间在0.75 h左右,毛蕊异黄酮达峰时间在1 h左右。灌胃8 h后大黄素、大黄酸、毛蕊异黄酮均表现为血药浓度迅速降低,仅有少量被检测到。总体而言,相比于毛蕊

异黄酮,大黄素和大黄酸在大鼠血浆中的含量较少、持续时间较短。

本研究建立了LC-MS/MS法测定芪雪浸膏剂中大黄素、大黄酸、毛蕊异黄酮的含量,并对3种主要成分在大鼠体内的药动学进行了考察,可为后续深入的体内药动学研究提供参考。

参考文献

- [1] 孙伟.益肾清利活血治疗慢性肾小球疾病的远期临床疗效研究[C]//中西医结合肾脏病学术会议专题讲座汇编.北京:中国中西医结合学会肾脏病专业委员会,2006:33-34.
- [2] 魏文娟,孙伟.益肾清利活血法治疗慢性肾炎性蛋白尿50例[J].河南中医,2016,36(11):1976-1978.
- [3] 李青,赵静,陈继鸿,等.益肾清利活血泻浊法延缓慢性肾衰竭的临床疗效分析[J].中国中西医结合肾病杂志,2017,18(12):1099-1100.
- [4] 吴汉利,孙伟.益肾清利活血法对肾虚湿瘀蛋白尿患者尿足细胞排泄的影响[J].中国医药导报,2017,14(7):81-84.
- [5] 赵静,陈继红.益肾清利和络方颗粒剂对慢性肾脏病3期患者尿蛋白定量、血肌酐和eGFR的临床疗效观察[J].中药材,2017,40(11):2701-2704.
- [6] 朱玮玮,孙伟.“益肾清利、和络泄浊”法对延缓中老年CKD3期患者病情进展的临床观察[J].中国继续医学教育,2017,9(25):109-111.
- [7] 郭建红,孙伟.孙伟应用益肾清利活血法治疗慢性肾脏病4期经验[J].山东中医药大学学报,2016,40(4):354-356.
- [8] 陈秀峰,王新华.益肾清利活血法治疗慢性肾小球肾炎分析[J].四川中医,2015,33(4):64-65.
- [9] 刘红,孙伟.黄芪治疗慢性肾脏病机制及其延缓细胞衰老研究[J].中华肾病研究电子杂志,2014,3(6):328-330.
- [10] 陆超,吴磊,刘志辉.LC-MS/MS法同时测定芪雪浸膏剂中9种成分的含量[J].中南药学,2017,15(9):1313-1318.
- [11] 容悦莹,冯素香,吴纯伟.大黄化学成分的药动学及其代谢的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(10):199-203.
- [12] 林青,李媛,谭晓梅,等.LC-MS/MS同时测定大鼠血浆中黄芪成分芒柄花素、毛蕊异黄酮和异鼠李素的浓度及其药动学研究[J].中药材,2013,36(4):589-593.
- [13] 田溪,梁振江,郭安然,等.前列安颗粒中芍药苷和连翘苷在大鼠体内的药动学研究[J].中国药房,2016,27(10):1363-1365.
- [14] 杜晓琳,黄娟,刘小娟,等.内标在LC-MS法生物样品分析中的相关问题探讨[J].中国新药杂志,2018,27(2):138-140.

(收稿日期:2018-07-06 修回日期:2018-08-18)

(编辑:唐晓莲)