

基于 UPLC-MS/MS 的苦参总黄酮自微乳大鼠体内药动学研究

李思远¹, 杨志欣^{1*}, 张文君³, 侯立强², 汲丽丽¹, 卞士嘉¹

1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学附属第二医院, 黑龙江 哈尔滨 150001

3. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-质谱 (UPLC-MS/MS) 同时测定大鼠血浆中苦参酮 (Kur)、槐属二氢黄酮 G (SFG) 和异黄酮醇 (Iso) 3 个成分的分析方法, 研究苦参总黄酮 (TF) 及苦参总黄酮自微乳 (TF-SMEDDS) 在大鼠体内的药动学过程和药动学参数。 **方法** 色谱柱采用 ACQUITY UPLC[®] HSS T3 C₁₈, 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水梯度洗脱, 体积流量 0.2 mL/min, 待测血浆样品采用醋酸乙酯液-液萃取法制备。电喷雾离子化电离源 (ESI) 以多反应离子监测 (MRM) 模式进行负离子方式检测, 芦丁为内标 (IS), DAS 2.0 软件处理数据。 **结果** TF 提取物中 Kur、SFG、Iso 分别在 (0.02~1 600.00)、(0.015~1 200.000)、(0.01~800.00) ng/mL 有良好的线性关系 (r^2 均大于 0.995 9); 精密度、准确度、平均提取回收率以及基质效应等均符合生物样品分析要求。TF 给药后, Kur、SFG 和 Iso 的半衰期 ($t_{1/2z}$) 分别为 (7.04±2.46)、(4.54±2.13)、(4.73±1.67) h, 药时曲线下面积 (AUC_{0-∞}) 分别为 (3 469.57±555.37)、(2 524.48±425.83)、(1 006.47±85.46) ng·h/mL; TF-SMEDDS 给药后, Kur、SFG 和 Iso 的 $t_{1/2z}$ 分别为 (13.10±2.67)、(11.47±4.17)、(12.67±4.97) h, AUC_{0-∞} 分别为 (13 002.49±2 498.09)、(8 070.80±2 264.62)、(3 918.85±429.76) ng·h/mL。TF-SMEDDS 中 Kur、SFG 和 Iso 的相对生物利用度分别为 374.76%、319.70%、389.37%。 **结论** 所建立的 UPLC-MS/MS 分析方法可用于苦参中 3 个成分在大鼠体内药动学研究, 制成自微乳后能够显著提高 TF 在大鼠体内的生物利用度。

关键词: 苦参; 黄酮; 苦参总黄酮自微乳; 超高效液相色谱-串联质谱; 血药浓度; 药动学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)20-5018-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.20.025

UPLC-MS/MS-based pharmacokinetics of self-microemulsion containing total flavonoids from *Sophora flavescens* in rats

LI Si-yuan¹, YANG Zhi-xin¹, ZHANG Wen-jun³, HOU Li-qiang², JI Li-li¹, BIAN Shi-jia¹

1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150001, China

3. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

Abstract: Objective To establish a UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of sophoraflavanone G (SFG), kurarinone (Kur), and isoxanthohumol (Iso) in rat plasma using rutin as the internal standard (IS), and to study the pharmacokinetic parameters of total flavonoids (TF) from *Sophora flavescens* and TF self-microemulsion drug delivery system (TF-SMEDDS) in rats. **Methods** Analysis was carried out on an ACQUITY UPLC[®] HSS T3 C₁₈ column using acetonitrile-0.1% formic acid in water as the mobile phase at a flow rate of 0.2 mL/min. The plasma samples were prepared by liquid-liquid extraction with ethyl acetate. The detection was performed on a triple quadrupole tandem mass spectrometer by multiple reaction monitoring with an electro-spray ionization source in negative ionization mode. All statistical analysis was performed using DAS 2.0 software package. **Results** The calibration curves of Kur, SFG, and Iso exhibited good linearity ($r^2 > 0.995 9$) over the range of (0.02—1 600.00), (0.015—1 200.000), and (0.01—800.00) ng/mL, respectively. Precision, accuracy, average extraction recovery, and matrix effects were all in line with biological sample analysis requirements. The pharmacokinetic parameters of Kur, SFG, and Iso from TF were as follows: $t_{1/2z}$ (7.04 ±

收稿日期: 2019-03-14

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (H2016057); 黑龙江省自然科学基金项目 (H2017066); 黑龙江中医药大学“优秀创新人才支持计划”项目 (2012, 2018); 国家教育部春晖计划 (Z2008-1-15016)

作者简介: 李思远 (1997—), 男, 从事中药学研究。E-mail: 1183281957@qq.com

*通信作者 杨志欣 (1974—), 女, 教授, 从事药物新剂型与新药研究。E-mail: zhixin.y@163.com

2.46), (4.54 ± 2.13), (4.73 ± 1.67) h, and AUC_{0-∞} (3 469.57 ± 555.37), (2 524.48 ± 425.83), (1 006.47 ± 85.46) ng·h/mL. The pharmacokinetic parameters of Kur, SFG, and Iso from TF-SMEDDS were as follows: $t_{1/2\alpha}$ (13.10 ± 2.67), (11.47 ± 4.17), and (12.67 ± 4.97) h, and AUC_{0-∞} (13 002.49 ± 2 498.09), (8 070.80 ± 2 264.62), (3 918.85 ± 429.76) ng·h/mL. The relative bioavailabilities of Kur, SFG, and Iso in TF-SMEDDS were approximately 374.76%, 319.70%, and 389.37%, respectively. **Conclusion** The UPLC-MS/MS method can be used to study the pharmacokinetics of three components in *S. flavescens* in rats. The bioavailability of TF-SMEDDS in rats was significantly increased.

Key words: *Sophora flavescens* Ait; flavonoids; total flavonoids from *Sophora flavescens*; UPLC-MS/MS; plasma concentration; pharmacokinetics

苦参药用由来已久,位列《本经》365 种本草之中品。梁·陶弘景《本草经集注》:“……渍酒饮,治疥杀虫”;唐·王焘《外台秘要》云:“……煮酒渍”疗“毒热足肿作痛欲脱者”;明·李时珍《本草纲目》:“苦参五升,在苦酒一斗中浸泡三、四天后服下”。现代研究表明,苦参中生物碱和黄酮是 2 大主要有效成分,后者极性弱于前者^[1-3]。推测古人用苦参杀虫、抗菌时非水煎或醋煮,而以酒为溶媒,主要是针对苦参中异戊烯基黄酮进行提取,而现代药理研究表明,其杀虫、抗菌活性显著且优于生物碱类,开发潜力很大^[4-7]。课题组前期研究发现,苦参总黄酮(total flavonoids from *Sophora flavescens*, TF)在水中的溶解度小,其中主要成分槐属二氢黄酮 G(sophoraflavanone G, SFG)和苦参酮(kurarinone, Kur)在大鼠体内绝对生物利用度仅为 36%和 17%^[8]。因此,采用新技术改善 TF 理化性质并提高其生物利用度对临床应用有重要意义。

自微乳(self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS)是在胃肠道内或轻微搅拌(37 °C)下自发形成粒径≤100 nm 的水包油型微乳。分散过程中,两相相互渗透形成许多小液滴,表面活性剂在内相和单胶束表面的交换使得体系产生巨大熵增,同时表面活性剂降低了油水界面张力,因而自微乳化是自发的,属于热力学稳定体系^[9],可用于提高疏水性及难溶性药物溶解度,增加生物膜的穿透性^[10]。本研究建立了灵敏、快速的超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS/MS)法考察苦参总黄酮自微乳(TF-SMEDDS)在大鼠体内药动学行为及生物利用度,测定大鼠血浆中 SFG、Kur 及异黄酮醇(isoxanthohumol, Iso) 3 个黄酮类成分,为 TF-SMEDDS 的开发提供实验数据。

1 材料

1.1 仪器

UPLC-MS/MS (美国 Waters 公司);
Forma-80 °C 低温冰箱(美国 Thermo 公司);

AB265-S 分析电子天平(上海梅特勒-托利多国际贸易有限公司); TGL-16C 台式离心机(上海安亭科学仪器厂); WH-1 微型涡旋混合器(上海沪西分析仪器厂有限公司); BF-2000 氮吹仪(北京八方世纪科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

苦参购自哈药集团世一堂制药厂(批号 20170520),经黑龙江中医药大学药学院王振月教授鉴定为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根。TF 提取物(实验室自制,批号 20170812),其中 Kur 质量分数为 22%,SFG 质量分数为 17%;对照品 Kur(批号 20171031)、SFG(批号 20171025)、Iso(批号 20171104),质量分数均≥98%,实验室自制;芦丁(IS,质量分数≥99.5%,批号 121254-20120316),中国食品药品检定研究院;甲酸(色谱纯)、甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯),Fisher 公司;甲醇(色谱纯),Dikma 公司;屈臣氏蒸馏水(中国屈臣氏集团)。

1.3 实验动物

SD 大鼠,SPF 级,体质量(250±20)g,雄性,黑龙江中医药大学 GLP 实验室提供,合格证号 SYXK(黑)2014-001。

2 方法与结果

2.1 TF 混悬液的制备

取苦参 100 g,醋酸乙酯超声(功率 300 W,频率 25 kHz)提取 2 次,每次 30 min,合并 2 次滤液(第 1 次 200 mL,第 2 次 150 mL),回收溶剂得固体粉末即得 TF。取 TF 粉末适量,1% CMC-Na 配制质量浓度为 100 mg/mL 的混悬液,用前充分摇匀。

2.2 TF-SMEDDS 的制备

精密称取三乙酸甘油酯 0.19 g、聚氧乙烯氢化蓖麻油 0.35 g、乙二醇单乙基醚 0.46 g 均匀搅拌 10 min,逐渐加入 TF 25 mg,待混匀充分,缓慢加入 100 mL 蒸馏水,于 37 °C 恒温水浴下 50 r/min 磁力搅拌 10 min,即得到澄清透明的 TF-SMEDDS

溶液, 载药量为 25.0 mg/g。

2.3 溶液的制备

2.3.1 混合对照品溶液 称取 Kur、SFG、Iso 对照品适量, 分别精密称定, 甲醇溶解定容至质量浓度分别为 2.0、1.5、1.0 mg/mL 的混合对照品储备液。甲醇为溶剂, 进一步稀释制备系列质量浓度的混合对照品溶液。其中 Kur 质量浓度分别为 16×10^3 、 8×10^3 、 4×10^3 、 2×10^3 、 1×10^3 、2、0.2 ng/mL, SFG 质量浓度分别为 12×10^3 、 6×10^3 、 3×10^3 、 1.5×10^3 、750、1.5、0.15 ng/mL, Iso 质量浓度分别为 8×10^3 、 4×10^3 、 2×10^3 、 1×10^3 、500、1、0.1 ng/mL。

2.3.2 内标溶液的制备 取 IS 对照品适量, 精密称定, 甲醇溶解定容至质量浓度为 1 mg/mL 的内标储备液, -20°C 储存, 用前以甲醇稀释至 600 ng/mL。

2.4 给药方案与血样采集

健康雄性 SD 大鼠 12 只, 给药前禁食 12 h, 自由饮水。随机分成 2 组, 分别 ig TF 混悬液和 TF-SMEDDS, 给药剂量 800 mg/kg, 分别于给药后 20、40 min 及 1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、12.0、24.0、48.0 h 后进行眼底静脉丛取血 (约 0.3 mL); 置于涂有肝素的 5.0 mL EP 管中, 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清血浆于 -20°C 保存, 分析之前解冻至室温。

2.5 血浆样品处理

精密加入 100 μL 大鼠血浆及 10 μL 内标工作溶

液至 5.0 mL EP 管中, 涡旋混合 30 s, 加入醋酸乙酯 (1.0 mL) 萃取, 混合 3 min。10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液置于 1.5 mL 的 EP 管中, 40°C 氮气流下吹干, 100 μL 甲醇复溶, 涡旋混合 3 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 移取上清液 80 μL 置于进样瓶, 上清液 (5 μL) 注入 UPLC-MS/MS 系统分析。

2.6 样品检测

2.6.1 色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC[®] HSS T3 C₁₈ column (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm , 美国 Waters 公司); 流动相为 A 乙腈-B 水 (0.1%甲酸), 梯度洗脱: 0~0.5 min, 35% A; 0.5~1.0 min, 35%~60% A; 1.0~4.0 min, 60%~85% A; 4.0~4.2 min, 85%~35% A; 4.2~5 min, 35% A。体积流量为 0.2 mL/min; 运行时间为 5 min; 柱温为 35°C ; 进样量为 5 μL 。

2.6.2 质谱条件 Waters 三重四级杆串联质谱仪 (TQD), 优化后的 Kur、SFG、Iso 和 IS 的检测方式为负离子模式扫描; 离子源为电喷雾离子源; 碰撞电压 3.3 kV, 源温度 150°C , 脱溶剂温度 350°C , 锥孔气体体积流量 50 L/h, 脱溶剂体积流量 650 L/h, 驻留时间 0.038 s。锥孔电压、碰撞能量、离子质荷比 (m/z) 和保留时间 (t_R) 见表 1。采用 Masslynx TM 4.1 收集并处理数据, 采用多重反应监测 (MRM) 模式进行扫描。

2.6.3 专属性考察 分别取空白血浆、空白血浆加混合对照品溶液及内标、大鼠 ig TF 混悬液及 TF-

表 1 Kur、SFG、Iso 和 IS 的质谱参数

Table 1 Parameters of mass spectrometer for Kur, SFG, Iso, and IS

样品	检测方式	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV	t_R/min
Kur	[M-H] ⁻	437.2	161.1	40	24	3.05
SFG	[M-H] ⁻	423.2	161.2	45	22	3.65
Iso	[M-H] ⁻	353.2	119.2	50	30	2.73
IS	[M-H] ⁻	609.3	300.3	75	35	1.48

SMEDDS 后血浆样本 (给药 1 h 的采血点), 按“2.5”项下方法处理后, 按“2.6.1”“2.6.2”项下条件分别进样 5 μL , 记录谱图。结果表明, 质谱检测均有很好的响应值, 成分结构和 MRM 扫描图谱见图 1。色谱图中 Kur、SFG、Iso 和 IS 的 t_R 分别为 3.05、3.64、2.73、1.48 min, 各峰峰形良好, 分离完全, 没有来自大鼠血浆杂质的内源性干扰, 见图 2。

2.6.4 标准曲线及最低定量限 取“2.3.1”项下系列混合对照品溶液 10 μL , 加入到 100 μL 空白血浆中, 按照“2.5”项下操作, 依次得到 Kur 质量浓度为 1 600、800、400、200、100、0.2、0.02 ng/mL,

SFG 质量浓度为 1 200、600、300、150、75、0.15、0.015 ng/mL, Iso 质量浓度为 800、400、200、100、50、0.1、0.01 ng/mL 的系列校准标准溶液, 依次注入 UPLC-MS/MS 系统分析, 进样量 5 μL , 记录峰面积。以待测物血药浓度为横坐标 (X), 待测物与内标的峰面积比值为纵坐标 (Y), 采用加权 ($1/x^2$) 最小二乘回归法计算线性回归方程的斜率、截距和平方回归系数。标准曲线方程及线性范围见表 2。在标准曲线最低质量浓度的基础上分别稀释 2、5、10 倍, 按照“2.5”项下处理样品, 测定最低定量限 (LLOQ), 见表 2。在 LLOQ 时样品中 Kur、SFG

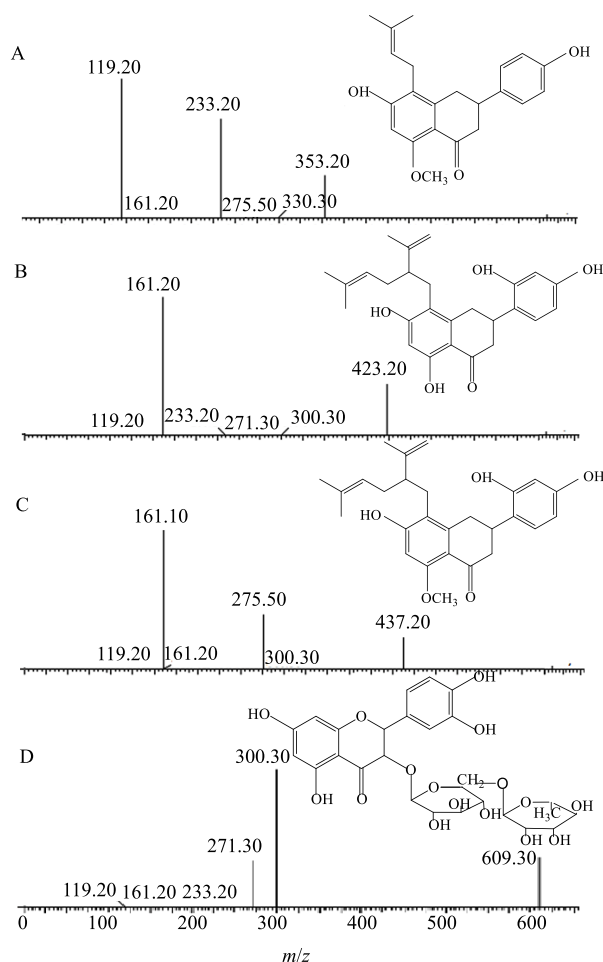
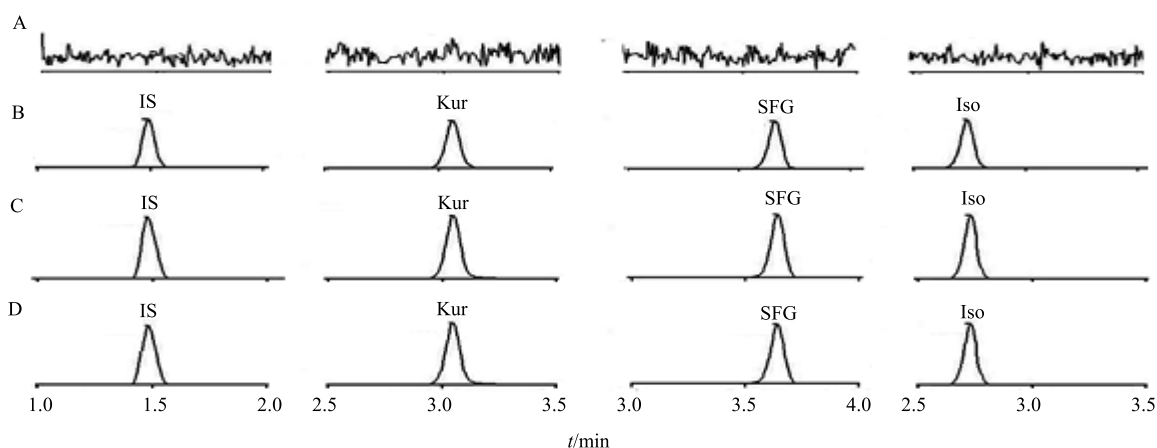


图 1 Iso (A)、SFG (B)、Kur (C) 和 IS (D) 的质谱图
Fig. 1 Mass spectra of Iso (A), SFG (B), Kur (C), and IS (D) in scan mode with an ESI (-) source

和 Iso 的准确度分别为 7.62%、8.97%、8.21%，精密度分别为 9.51%、8.69%、9.74%，符合方法学要求。

2.6.5 精确度与准确度 按照“2.5”项下所述方法制备低、中、高 3 种质量浓度的质控 (QCs) 溶液，低质量浓度 QCs 溶液中 Kur、SFG、Iso 的质量浓度分别为 0.2、0.15、0.1 ng/mL，中质量浓度的 QCs 溶液中 Kur、SFG、Iso 的质量浓度分别为 200、150、100 ng/mL，高质量浓度的 QCs 溶液中 Kur、SFG、Iso 的质量浓度分别为 1 280、960、640 ng/mL。另取“2.6.4”项下 LLOQ 溶液。每个质量浓度溶液测定 6 份，连续测定 3 d，精密度以 RSD 表示，准确度以 RE 表示，结果见表 3，精密度、准确度均在 15% 以内，符合测定要求。

2.6.6 提取回收率与基质效应 取“2.6.5”项下配制的 QC 溶液及“2.6.4”项下 LLOQ 共 4 个质量浓度的溶液，每个质量浓度水平测定 6 份，进样 5 μ L，UPLC-MS/MS 检测，记录峰面积 A_1 。另取空白血浆 100 μ L 按照“2.5”项下步骤处理，残渣再分别加入 Kur 质量浓度分别为 0.002、0.2、200、1 280 ng/mL，SFG 质量浓度分别为 0.001 5、0.15、150、960 ng/mL，Iso 质量浓度分别为 0.001、0.1、100、640 ng/mL 的混合对照品溶液 10 μ L、内标溶液 10 μ L，40 $^{\circ}$ C 氮气流下吹干后，甲醇复溶，上清液 5 μ L 注入 UPLC-MS/MS，记录峰面积 A_2 。上述 4 个质量浓度的混合对照品溶液分别加入到 EP 管中，氮气吹干，甲醇复溶，上清液 5 μ L 注入 UPLC-MS/MS，记录峰



A-空白血浆 B-空白血浆加入内标、Kur、SFG 和 Iso C-ig TF 混悬液 1 h 后的血浆样品 D-ig TF-SMEDDS 1 h 后的血浆样品
A-blank plasma sample B-blank plasma sample spiked with Kur, SFG, Iso, and IS respectively C-1 h after oral administration of TF suspension plasma D-1 h after oral administration of TF-SMEDDS plasma

图 2 Kur、SFG、Iso 和 IS 的血浆样品色谱图
Fig. 2 Representative chromatograms of Kur, SFG, Iso, and IS in rat plasma samples

面积 A_3 。其中,以 A_1/A_2 计算提取回收率, A_2/A_3 计算基质效应,结果见表 3。结果表明, Kur、SFG、Iso 的平均提取回收率分别为 80.34%~84.21%、79.53%~84.47%、79.89%~83.91%,该分析方法符合药动学样品测定的要求;基质效应小,不影响测定,符合要求。

2.6.7 稳定性考察 取“2.6.5”项下配制的 QC 溶液及“2.6.4”项下 LLOQ 共 4 个质量浓度的溶液,每个质量浓度测定 3 份样品,分别在室温下放置 6 h、10 ℃放置 24 h、-20 ℃冰箱反复冷冻 3 个周期、-20 ℃冰箱长期贮存 30 d 考察短期稳定性、自动进样器稳定性、反复冻融及长期稳定性。结果见表 4,

表 2 Kur、SFG 和 Iso 的线性方程及最低定量限

Table 2 Linear equation and limit of quantitation of Kur, SFG, and Iso

成分	最低定量限/(ng·mL ⁻¹)	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	线性方程	r^2
Kur	0.002 0	0.020~1 600	$Y=0.026 1 X+0.514 1$	0.997 7
SFG	0.001 5	0.015~1 200	$Y=0.004 5 X+0.208 6$	0.995 9
Iso	0.001 0	0.010~800	$Y=0.037 3 X+0.114 6$	0.998 9

表 3 精密度、准确度及提取回收率测定结果 ($n=6$)Table 3 Precision, accuracy, recovery, and matrix effect of QC samples in rat plasma ($n=6$)

成分	ρ /(ng·mL ⁻¹)	RSD/%		RE/%		提取回收率/%	基质效应/%
		日内精密度	日间精密度	日内准确度	日间准确度		
Kur	0.002 0	9.32	8.82	9.75	11.71	80.34±2.45	92.37±8.17
	0.200 0	8.24	7.91	9.54	10.84	81.52±0.84	90.53±5.55
	200.000 0	6.37	5.92	7.38	-8.73	84.21±2.25	93.54±7.32
	1 280.000 0	2.15	3.31	8.32	10.17	83.68±1.91	92.82±6.87
SFG	0.001 5	9.31	9.02	11.67	10.51	79.53±2.57	90.33±7.93
	0.150 0	8.76	7.13	10.53	9.37	81.38±2.24	91.41±7.18
	150.000 0	6.72	8.81	8.17	8.61	83.65±2.18	92.75±5.62
	960.000 0	2.35	4.24	6.72	9.58	84.47±0.67	91.27±4.54
Iso	0.001 0	9.56	9.65	10.28	8.97	79.89±2.74	93.86±7.25
	0.100 0	8.44	9.27	10.74	8.44	80.37±1.63	91.37±5.91
	100.000 0	7.34	5.52	8.58	6.59	82.63±1.61	92.45±9.15
	640.000 0	4.01	3.78	6.35	5.74	83.91±1.27	91.53±6.26

表 4 Kur、SFG、Iso 稳定性结果 ($n=6$)Table 4 Summary of stability of Kur, SFG, and Iso under various storage conditions ($n=6$)

条件	Kur			SFG			Iso		
	ρ /(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	RE/%	ρ /(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	RE/%	ρ /(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	RE/%
室温, 6 h	0.002 0	7.82	6.85	0.001 5	8.45	10.52	0.001 0	9.65	7.97
	0.200 0	5.74	-7.51	0.150 0	5.44	7.24	0.100 0	8.28	5.85
	200.000 0	7.35	8.37	150.000 0	6.89	6.78	100.000 0	4.84	-6.71
	1 280.000 0	3.52	-5.95	960.000 0	3.22	5.84	640.000 0	3.83	8.16
10 ℃, 24 h	0.002 0	9.28	8.63	0.001 5	9.57	-10.47	0.001 0	9.51	10.44
	0.200 0	8.61	7.47	0.150 0	7.85	11.83	0.100 0	6.45	-9.25
	200.000 0	6.13	8.35	150.000 0	6.37	6.14	100.000 0	7.96	6.97
	1 280.000 0	4.07	-9.74	960.000 0	5.21	7.58	640.000 0	4.17	7.31
反复冻融 3 次	0.002 0	14.31	7.32	0.001 5	13.75	6.37	0.001 0	14.15	8.57
	0.200 0	11.72	8.62	0.150 0	10.29	-8.81	0.100 0	10.83	8.18
	200.000 0	7.99	9.57	150.000 0	8.47	9.45	100.000 0	7.37	6.83
	1 280.000 0	6.58	6.95	960.000 0	5.85	6.74	640.000 0	6.82	-10.81
-20 ℃, 30 d	0.002 0	13.55	-7.33	0.001 5	11.62	9.85	0.001 0	14.06	9.56
	0.200 0	10.34	9.57	0.150 0	9.77	10.14	0.100 0	11.35	8.58
	200.000 0	5.51	7.55	150.000 0	7.49	7.28	100.000 0	8.47	7.67
	1 280.000 0	9.42	9.11	960.000 0	6.54	-7.84	640.000 0	8.25	8.74

RSD 与 RE 值均在 15% 以内, 提示血浆样品稳定性良好。

2.7 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 DAS (Drug and Statistics) 2.0 软件对大鼠血浆浓度与时间的非房室模型进行分析, 计算药动学参数。

2.8 药动学研究

取每个时间点的各个血浆样品, 按照“2.5”项下处理, 分析记录 Kur、SFG、Iso 和 IS 的峰面积, 计算各成分的血药浓度, 分别绘制 TF 混悬液及 TF-SMEDDS 给药后 Kur、SFG、Iso 的平均血药浓度-时间曲线, 结果见图 3~5。以 DAS 2.0 软件拟合平均血药浓度-时间曲线和药动学参数。将 TF 混悬液和 TF-SMEDDS 给药组大鼠 Kur、SFG 和 Iso 的平均血药浓度分别按一室、二室、三室模型进行模拟, 获得赤池信息量准则 (AIC) 值和 r^2 , 根据 AIC 值最小和 r^2 值最大原则, 确定 TF 混悬液和 TF-SMEDDS 给药后 Kur、SFG 和 Iso 在大鼠体内的药-时过程均符合一室开放模型 (权重 1/CC), 药动学统计矩参数见表 5。TF-SMEDDS 相对 TF 原料药的相对生物利用度 ($F_{\text{相对}} = (\text{AUC}_{\text{原料药}} \times D_{\text{制剂}}) / (\text{AUC}_{\text{制剂}} \times D_{\text{原料药}})$), 其中 D 为给药量。计算得到 TF-SMEDDS 中 Kur、SFG 和 Iso 的 $F_{\text{相对}}$ 分别为 374.76%、319.70%、389.37%, 提示制成自微乳后能够显著提高 TF 在大鼠体内的生物利用度。

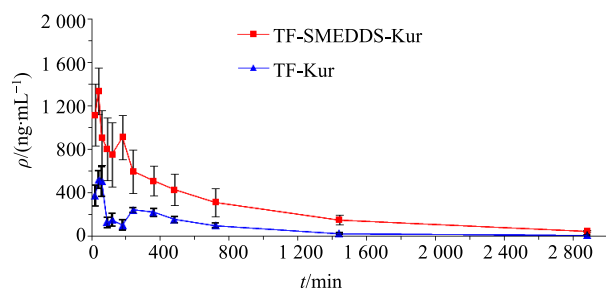


图 3 大鼠 ig TF、TF-SMEDDS 后 Kur 的血药浓度-时间曲线
Fig. 3 Concentration time curve of Kur in TF and TF-SMEDDS after ig treatment

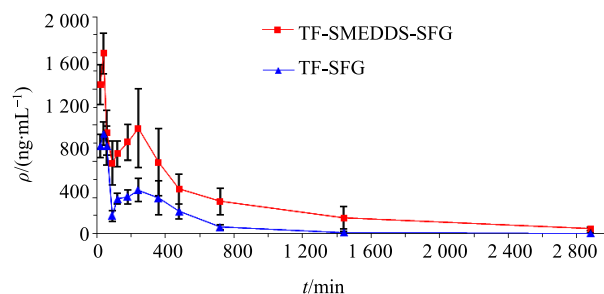


图 4 大鼠 ig TF、TF-SMEDDS 后 SFG 的血药浓度-时间曲线
Fig. 4 Concentration time curve of SFG in TF and TF-SMEDDS after ig treatment

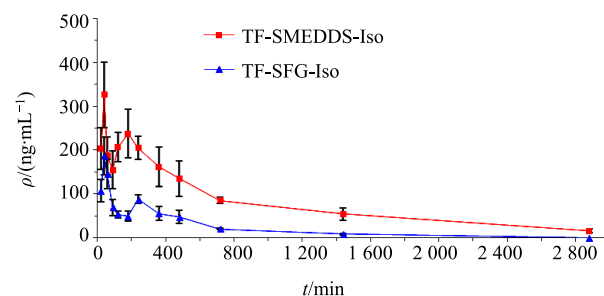


图 5 大鼠 ig TF、TF-SMEDDS 后 Iso 血药浓度-时间曲线
Fig. 5 Concentration time curve of Iso in TF and TF-SMEDDS after ig treatment

$D_{\text{原料药}}$), 其中 D 为给药量。计算得到 TF-SMEDDS 中 Kur、SFG 和 Iso 的 $F_{\text{相对}}$ 分别为 374.76%、319.70%、389.37%, 提示制成自微乳后能够显著提高 TF 在大鼠体内的生物利用度。

3 讨论

本研究选取雄性大鼠开展 TF 提取物及 TF-SMEDDS 的药动学研究是基于预试验的考察结果, 研究表明 3 个成分在不同性别大鼠的代谢数据差别不明显。而雄性大鼠在实验过程中生命状态更为理想, 参考文献方法^[11]本实验亦采用雄性大鼠进行研究。

表 5 TF 混悬液和 TF-SMEDDS 中 Kur、SFG 和 Iso 的主要统计矩参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Main statistical moment parameters of Kur, SFG, and Iso in TF suspension and TF-SMEDDS ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	TF 混悬液			TF-SMEDDS		
		Kur	SFG	Iso	Kur	SFG	Iso
$t_{1/2z}$	h	7.04±2.46	4.54±2.13	4.73±1.67	13.10±2.67	11.47±4.17	12.67±4.97
t_{max}	h	0.80±0.15	0.75±0.12	0.70±0.01	0.70±0.01	0.70±0.01	1.08±0.94
C_{max}	ng·mL ⁻¹	555.54±124.49	579.80±56.14	187.19±42.71	1338.58±216.57	996.95±114.41	338.49±50.13
AUC_{0-t}	ng·h·mL ⁻¹	3416.78±531.83	2511.12±418.15	1004.48±87.98	12092.96±2636.20	7629.10±1915.44	3620.44±288.40
$\text{AUC}_{0-\infty}$	ng·h·mL ⁻¹	3469.57±555.37	2524.48±425.83	1006.47±85.46	13002.49±2498.09	8070.80±2264.62	3918.85±429.76
$\text{MRT}_{0-\infty}$	h	12.08±2.47	6.51±1.75	8.92±1.07	16.45±3.24	14.34±3.21	17.86±4.66

血浆样品处理方法对于获得较为理想的提取回收率和基质效应有直接影响, 研究中对比了 3 个黄酮类成分在诱导蛋白质沉淀法、液-液萃取法中的提取回收率和基质效应。结果表明, 以甲醇或乙腈为溶剂的诱导蛋白质沉淀法提取回收率较低; 考察了醋酸乙酯、二氯甲烷、乙醚 3 种溶剂的液-液萃取效率, 结果采用醋酸乙酯提取 3 个黄酮类成分均可获得较高的提取回收率, 且无基质效应影响, 重现性好。本研究中首次建立了同时测定大鼠血浆中 3 个成分的分析方法, 该法具有简便、高效、快速、准确、特异性强等优点, 可用于 TF 及其制剂在大鼠体内药动学研究。

大鼠 ig 给予 TF-SMEDDS 后, Kur、SFG 和 Iso 的药动学参数较给予 TF 均发生了较为显著的变化, $C_{\max}$ 、AUC 显著增加, 提示 TF-SMEDDS 显著提高 TF 在大鼠体内的吸收。研究表明, SMEDDS 影响药物吸收的机制可能与以下因素有关^[12-14]: 胃脂肪酶有助于消化脂质, SMEDDS 在胃蠕动和胃排空辅助下可促使药物在进入十二指肠前乳化; 小肠中存在外源性脂质可刺激胆汁盐、磷脂和胆固醇的分泌, 引起肠道混合胶束的形成, 药物增溶; 改变肠壁的物理屏障功能, 影响肠道通透性从而增加药物的渗透性等等。此外, TF-SMEDDS 的 $t_{1/2z}$ 和 $MRT_{0-\infty}$ 显著增加, 提示 TF-SMEDDS 在大鼠体内能够长时间维持在一定的血药浓度范围, 延长药物在大鼠体内的吸收。推测可能是由于药物脂质停留时间延长引起胃排空延迟及某些表面活性剂和脂质使肠壁外排转运体活性降低, 从而使药物代谢和外排活性降低, 增加了药物吸收的数量及时间^[14-15]。

比较 3 组药时曲线发现, TF 混悬液和 TF-SMEDDS 中 Kur、SFG 和 Iso 均存在明显的双峰现象, 这在中药口服给药中是比较常见的^[16-18], 可能与胃肠道的多吸收部位、肠-肝循环、肠-胃循环等生理因素以及剂型因素等有关^[19]。课题组前期研究发现, 在不同 pH 磷酸盐缓冲液中 TF 极微溶解或不溶解, 不同 pH 条件下油水分配系数 ($\lg P_{app}$) 均大于 1, 提示药物的脂溶性较好。有研究表明^[20-22], 脂溶性好的药物往往在吸收后迅速分布到组织中, 当血液中的药物代谢到一定程度后, 组织中的药物可能二次释放入血导致双峰的出现。然而, Kur、SFG、Iso 3 个脂溶性黄酮类化合物是否因此产生双峰尚需进一步实验验证。对黄酮类成分而言, 肝肠循环也是常见原因, 柚皮素 (naringenin) 的吸收双峰现象即是由肝肠循环引起^[23]。综上, 本实验中 3

个成分出现吸收双峰的原因尚需通过胆汁引流、小肠吸收实验等进一步研究判断。

参考文献

- [1] 杨志欣, 程 静, 张文君, 等. 苦参总黄酮磷脂复合物的制备及优化 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(3): 342-346.
- [2] 杨志欣, 王海威, 张文君, 等. 苦参总黄酮含量测定方法的优化 [J]. 中成药, 2017, 39(5): 946-951.
- [3] 王 益, 李婉蓉, 杨佳佳, 等. 氧化苦参碱磷脂复合物自乳化释药系统的研制 [J]. 中草药, 2018, 49(18): 4277-4283.
- [4] 杨志欣, 李 霞, 刘明玉, 等. 苦参总黄酮抗菌提取物中 7 种黄酮成分的结构鉴定及含量测定研究 [J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(24): 2169-2174.
- [5] 郑永权, 姚建仁, 邵向东. 苦参杀虫抑菌活性成分研究 [J]. 农药学报, 1999, 1(3): 91-93.
- [6] Kuroyanagi M, Arakawa T, Hirayama Y, et al. Antibacterial and antian drogen flavonoids from *Sophora flavescens* [J]. *Nat Prod*, 1999, 62(12): 1595-1599.
- [7] Sohn H Y, Son K H, Kwon G S, et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai [J]. *Phytomedicine*, 2004, 11(7/8): 666-672.
- [8] Yang Z X, Zhang W J, Li X, et al. UPLC-MS/MS determination of sophoraflavanone G and kurarinone in rat plasma and application to pharmacokinetic study [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(22): 4344-4353.
- [9] 王 益, 李婉蓉, 杨佳佳, 等. 氧化苦参碱磷脂复合物自乳化释药系统的研制 [J]. 中草药, 2018, 49(18): 4277-4283.
- [10] Dokania S, Joshi A K. Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS)-challenges and road ahead [J]. *Drug Deliv*, 2015, 22(6): 675-690.
- [11] Zhang W M, Li R F, Qiu J F, et al. Determination of kurarinone in rat plasma by UPLC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, doi: 10.1016/j.jchromb.2015.02.005.
- [12] O'Driscoll C M. Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2002, 15(5): 405-415.
- [13] O'Driscoll C M, Griffin B T. Biopharmaceutical challenges associated with drugs with low aqueous solubility-the potential impact of lipid based formulations [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(6): 617-624.
- [14] Swenson E S, Milisen W B, Curatolo W. Intestinal

- permeability enhancement: Efficacy, acute local toxicity, and reversibility [J]. *Pharm Res*, 1994, 11(8): 1132-1142.
- [15] Patterwar S, Kasture S, Pande V, *et al.* Self micro-emulsifying drug delivery system: A lipid based drug delivery system [J]. *Inter J Pharm Sci Res*, 2016, 7(2): 443-452.
- [16] 刘昌顺, 龙晓英, 梁浩明, 等. 黄芩苷及其磷脂复合物与自微乳在大鼠体内的药动学比较性研究 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24(2): 195-198.
- [17] 张彩凤, 刘银花, 王雅溶, 等. 西红花苷和西红花酸的药动学及制剂学研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(1): 234-242.
- [18] 杨志欣, 李霞, 张文君, 等. UPLC-MS/MS 测定大鼠血浆苦参酮的浓度及其药动学研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(6): 834-839.
- [19] 魏凤环, 王永刚, 罗佳波. 药动学多峰现象研究概况 [J]. 中国药学杂志, 2005, 40(23): 1772-1774.
- [20] Lang Q, Kwang Y H, Wai C M. Selective dissolution and one step separation of terpene trilactones in ginkgo leaf extracts for GC-FID determination [J]. *Talanta*, 2001, 54(4): 673-680.
- [21] Beek T A V, Veldhuizen A V, Lelyveld G P, *et al.* Quantitation of bilobalide and ginkgolides A, B, C and J by means of nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Phytochem Anal*, 1993, 4(6): 261-268.
- [22] 柴战欣, 宋英, 高彩芳, 等. 国产与进口银杏叶片萜类内酯 Beagle 犬生物利用度的比较国产与进口银杏叶片萜类内酯 Beagle 犬生物利用度的比较 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2840-2844.
- [23] Ma Y, Li P, Chen D, *et al.* LC/MS/MS quantitation assay for pharmacokinetics of naringenin and double peaks phenomenon in rats plasma [J]. *Int J Pharm*, 2006, 307(2): 292-299.