

大黄蒽醌在大鼠体内的药动学研究

于飞¹, 李苏宁^{2*}

1. 北京大学第一医院, 北京 100034

2. 中国生物技术发展中心, 北京 100039

摘要: **目的** 建立 HPLC-MS/MS 法同时检测大鼠 ig 大黄蒽醌后血浆中大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚和番泻苷 A, 研究大黄蒽醌在大鼠体内的药动学。 **方法** 采用 Shim-pack VP-ODS C₁₈ 色谱柱 (150 mm×2 mm, 5 μm); 流动相为含 0.1% 甲酸、2 mmol/L 乙酸铵的水溶液-乙腈, 采用梯度洗脱方式; 柱温 40 °C; 体积流量 0.3 mL/min。采用电喷雾离子源 (ESI), 多重反应监测 (MRM) 模式扫描, 负离子方式检测。SD 大鼠分别 ig 37.5、75、150 mg/kg 大黄蒽醌, 分别于给药后 0、0.083、0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、6、8、12、24 h 取血, 采用 HPLC-MS/MS 法测定血药浓度, 绘制血药浓度-时间曲线, 采用 WinNonlin 软件进行数据分析, 计算药动学参数。 **结果** 各蒽醌类成分在选定的质量浓度范围内线性关系良好。在低、中、高 3 个质量浓度下 6 种成分的提取回收率为 88.22%~102.04%, 基质效应为 89.26%~106.01%。在 37.5 mg/kg 剂量组中, 仅检测到大黄酸、大黄素和芦荟大黄素; 在 75、150 mg/kg 剂量组中, 检测到大黄酸、大黄素、芦荟大黄素和大黄酚。在 3 个剂量组中均未检测到大黄素甲醚和番泻苷 A。大黄酸在体内迅速吸收, 3 个剂量组中均在 30 min 内就达到最大血药浓度 (C_{max})。大黄酸、大黄素、芦荟大黄素和大黄酚 C_{max} 和曲线下面积 (AUC_{0-∞}) 均随剂量的增加而增加, 具有剂量相关性。血浆清除率 (CL/F) 和表观分布容积 (V/F) 不随剂量增加而明显改变, 此 4 个成分药动学标志物的药动学行为呈线性动力学特征。 **结论** 建立了同时测定大鼠血浆中大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚和番泻苷 A 6 种成分的 HPLC-MS/MS 方法, 适用于大黄蒽醌在大鼠体内的药动学研究。

关键词: 大黄蒽醌; 大黄酸; 大黄素; 芦荟大黄素; 大黄酚; 大黄素甲醚和; 番泻苷 A; 药动学; HPLC-MS/MS 法

中图分类号: R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2017)12-2313-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.12.006

Pharmacokinetics of rhubarb anthraquinones in rats

YU Fei¹, LI Su-ning²

1. Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

2. China National Center for Biotechnology Development, Beijing 100039, China

Abstract: Objective To establish HPLC-MS/MS method for the determination of rhein, emodin, aloe-emodin, chrysophanol, physcion and sennoside A from rhubarb anthraquinones in rats plasma, and study pharmacokinetics of rhubarb anthraquinones in rat. **Methods** HPLC-MS/MS method was adopted on Shimadzu VP-ODS C₁₈ column (150 mm × 2 mm, 5 μm). The mobile phase was consisted of water (0.1% formic acid and 2 mmol/L ammonium acetate) - acetonitrile with gradient elution at a flow rate of 0.3 mL/min, and the temperature was 40 °C. Electrospray ionization (ESI) source and multiple-reaction monitoring (MRM) was performed in the negative ion mode. SD rats were ig administered with 37.5, 75, and 150 mg/kg rhubarb anthraquinone, respectively, and then serial blood samples were collected at 0, 0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, and 24 h, respectively. The plasma concentration was determined by HPLC-MS/MS method, and Mean plasma concentration-time curves were drawn. The data were analyzed by WinNonlin software, and the pharmacokinetic parameters were calculated. **Results** There were good linear relationships of rhubarb anthraquinones in the concentration ranges. Under low, medium, and high concentrations, the extraction recovery and matrix effect were 88.22% — 102.04% and 89.26% — 106.01%, respectively. Rhein, emodin, and aloe emodin were detected only in 37.5 mg/kg dose group. Rhein, emodin, aloe emodin, and chrysophanol were detected in 75 and 150 mg/kg dose groups. Emodin and sennoside A were not detected in all three groups. Rhein was absorbed rapidly and the maximum blood concentration (C_{max}) was reached within

收稿日期: 2017-06-18

作者简介: 于飞, 女, 助理研究员。研究方向为药理学及医疗价格管理。Tel: (010) 83572211 E-mail: faye.yufei@gmail.com

*通信作者 李苏宁, 女, 助理研究员, 研究方向: 药理学及临床医学科研管理。Tel: (010) 88225100 E-mail: lisen@cncbd.org.cn

30 min in three dose groups. C_{max} and $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ of rhein, emodin, aloe emodin, and chrysophanol were increased with the increase of dose, and it had a dose-dependent manner. The plasma clearance rate (CL/F) and apparent distribution volume (V/F) did not change significantly with the increase of dose. The pharmacokinetic behavior of these 4 rhubarb anthraquinones showed a linear dynamic characteristic. **Conclusion** HPLC-MS/MS method is established for the simultaneous determination of rhein, emodin, aloe emodin, chrysophanol, emodin and sennoside A in rat plasma, which is suitable for pharmacokinetic study of rhubarb Anthraquinones in rats.

Key words: rhubarb anthraquinones; rhein; emodin; aloe-emodin; chrysophanol; physcion; sennoside A; pharmacokinetics; HPLC-MS/MS

大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum. palmatum* L.、唐古特大黄 *R. tanguticum* Maxim. ex Balf. 和药用大黄 *R. officinale* Baill. 的干燥根和根茎^[1], 主要活性成分为蒽醌类衍生物, 分为游离型和结合型。游离型蒽醌有大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚等, 结合型蒽醌主要为番泻苷 A~F^[2]。目前对大黄中活性成分的药动学研究主要集中在蒽醌类主成分大黄酸^[3-4], 对其他含量较低的蒽醌类成分的研究较少, 制约了对大黄更深入的研究。另外, 目前临床使用的大黄总蒽醌胶囊是大黄蒽醌提取物制成的中药制剂, 其药效物质为蒽醌类成分, 但其药动学研究未有详尽阐述。目前国内外已有文献报道采用 HPLC 法测定大黄蒽醌类成分^[5-6], 也有采用 HPLC-MS/MS 法测定大黄提取物在血浆中大黄酸和大黄素的血药浓度^[7-8]。因此, 本实验建立了同时测定大鼠血浆中大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚和番泻苷 A 的 HPLC-MS/MS 方法, 并将其应用于大鼠体内药动学研究, 为大黄药动学标志物的研究以及临床指导用药提供参考。

1 材料

1.1 仪器

HPLC-MS/MS 高效液相色谱-串联四极杆质谱联用仪: 岛津高效液相色谱系统, 包括 DGU-20A3 在线脱气装置, LC-20AD XR 泵, CTO-20A 柱温箱和 SIL-20ACXR 自动进样器; AB SCIEX 三重四级 5500 质谱分析及检测系统, 配有电喷雾离子源 (ESI) 和工作软件 (Analyst 1.5.1)。Milli-Q Gradient A10 超纯水器 (Millipore 公司), Centrifuge 5810R 台式高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司)。

1.2 药品和试剂

大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚和番泻苷 A 对照品 (南京泽朗生物科技有限公司, 质量分数均 $\geq 98\%$, 批号分别为 150324、150326、150406、150129、150514、150519), 雌酮 (北京百灵威科技有限公司, 质量分数 $\geq 99\%$, 批号 438013)。大黄蒽醌 (含大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚和番泻苷 A 质量分数分别

为 42.95%、26.72%、14.69%、1.50%、0.49%、3.91%, 批号 ZL20150310DH, 南京泽朗生物科技有限公司)。甲醇 (色谱纯, Merck 公司), 乙腈 (色谱纯, Fisher 公司), 其余试剂均为市售分析纯。

1.3 动物

雄性 SD 大鼠, 体质量 200 ± 20 g, 购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 动物生产许可证号 SCXK (沪) 2013-0016, 给药前禁食 12 h, 自由饮水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Shim-pack VP-ODS C_{18} 色谱柱 (150 mm \times 2 mm, 5 μ m); 流动相为含 0.1% 甲酸、2 mmol/L 乙酸铵的水溶液 (A) - 乙腈 (B), 采用梯度洗脱方式: 0~1.00 min, B 10%; 1.01~2.50 min, B 10%~75%; 2.51~4.00 min, B 75%~98%; 4.01~7.00 min, B 98%; 7.01~7.50 min, B 98%~10%; 7.51~10.00 min, B 10%; 柱温 40 $^{\circ}$ C; 体积流量 0.3 mL/min。

2.2 质谱条件

采用电喷雾离子源 (ESI), 多重反应监测 (MRM) 模式扫描, 负离子方式检测。设定源参数: 喷雾电压为 4 500 V, 温度 500 $^{\circ}$ C, 喷雾气为 13 Arb, 气帘气为 20 Arb, 碰撞气为 Medium。待测成分和内标 MRM 参数见表 1, 扫描时间均为 50 ms。

2.3 溶液的配制

精密称取大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚和番泻苷 A 对照品适量, 以适量 DMSO 溶解并用甲醇加至量瓶中, 制成分别含大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚和大黄素甲醚 10 μ g/mL, 含番泻苷 A 100 μ g/mL 的混合对照品储备液。精密移取混合对照品储备液, 用甲醇等比稀释, 得到大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚和大黄素甲醚系列质量浓度范围为 0.05~10 μ g/mL, 番泻苷 A 系列质量浓度范围为 0.5~100 μ g/mL 的混合对照品工作液, 4 $^{\circ}$ C 贮藏, 备用。精密称取雌酮对照品适量, 用甲醇溶解并定容至量瓶中, 得内标储备液。精密吸取内标储备液适量, 用甲醇稀释成 20 μ g/mL 内标溶液, 4 $^{\circ}$ C 贮藏, 备用。

表1 定量离子和质谱参数
Table 1 Quantitative ion and MS parameters

| 待测物 | 母离子 <i>m/z</i> | 子离子 <i>m/z</i> | 去簇电压/V | 碰撞电压/V |
|---------|----------------|----------------|--------|--------|
| 大黄酸 | 283.0 | 183.0 | 110 | 22 |
| 大黄素 | 269.0 | 241.0 | 160 | 40 |
| 芦荟大黄素 | 269.1 | 240.0 | 170 | 32 |
| 大黄酚 | 253.1 | 225.0 | 140 | 40 |
| 大黄素甲醚 | 283.1 | 240.0 | 185 | 35 |
| 番泻苷 A | 861.1 | 699.1 | 160 | 45 |
| 雌酮 (内标) | 269.1 | 145.0 | 180 | 55 |

2.4 血浆样品处理方法

于 1.5 mL 离心管中精密加入大鼠血浆样品 100 μ L、内标溶液 10 μ L、2 mol/L 盐酸 10 μ L，混匀，加入醋酸乙酯 1 mL，震荡 5 min，8 000 r/min 离心 5 min，取上层有机相 800 μ L，氮气流吹干，100 μ L 甲醇溶解残渣，震荡 5 min，18 000 r/min 离心 5 min，取上清 5 μ L 进样。

2.5 方法专属性试验

对大鼠空白血浆、空白血浆+待测成分+内标、给药后大鼠血浆样品进行处理，进样测定，色谱图见图 1。大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、番泻苷 A 和内标的保留时间分别为 5.6、5.3、5.3、6.4、6.6、4.2、5.4 min。血浆中内源性物质不干扰测定，且峰形良好，基线噪音小。

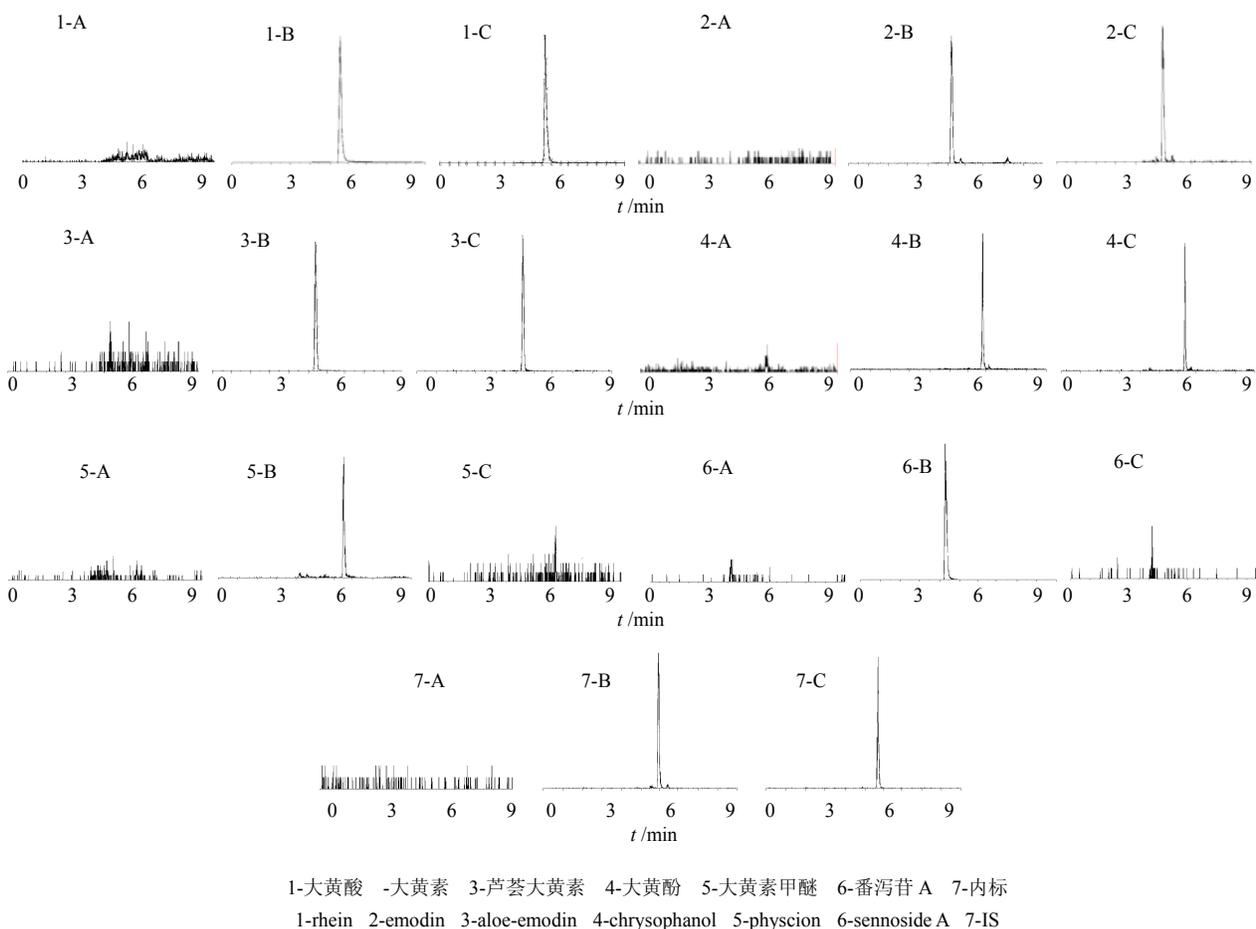


图1 空白血浆 (A)、空白血浆+混合对照品溶液 (B) 和大鼠血浆样品 (C) 的 HPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 1 HPLC-MS/MS chromatograms of blank plasma (A), blank plasma + reference substance + IS (B), and plasma sample (C)

2.6 标准曲线和线性范围

精密吸取系列质量浓度的混合对照品工作液 10 μL , 挥干后分别加空白血浆 100 μL , 制成大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚和大黄素甲醚终质量浓度范围为 5~1 000 ng/mL , 番泻苷 A 终质量浓度范围为 50~10 000 ng/mL 的系列血浆样品。按

2.4 项下方法进行处理后进样测定。以待测物峰面积与内标峰面积比对待测物的质量浓度以加权 (权重系数为 $1/X$) 最小二乘法进行线性回归, 得大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚和番泻苷 A 的回归方程, 见表 2, 结果表明各蒽醌类成分在选定的质量浓度范围内线性关系良好。

表 2 标准曲线和线性范围

Table 2 Calibration curves and linear range

| 成分 | 线性方程 | r | 线性范围/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$ | 定量限/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$ |
|-------|----------------------------|---------|--|---------------------------------------|
| 大黄酸 | $Y=0.240\ 00\ X+0.109\ 00$ | 0.999 5 | 5~1 000 | 5 |
| 大黄素 | $Y=0.004\ 66\ X+0.018\ 80$ | 0.998 9 | 5~1 000 | 5 |
| 芦荟大黄素 | $Y=0.090\ 10\ X+0.107\ 00$ | 0.999 2 | 5~1 000 | 5 |
| 大黄酚 | $Y=0.001\ 09\ X+0.014\ 90$ | 0.997 4 | 5~1 000 | 5 |
| 大黄素甲醚 | $Y=0.001\ 02\ X+0.004\ 83$ | 0.997 8 | 5~1 000 | 5 |
| 番泻苷 A | $Y=0.002\ 62\ X+0.040\ 70$ | 0.999 6 | 50~10 000 | 50 |

2.7 准确度和精密度试验

分别取不同质量浓度的混合对照品溶液, 配制低、中、高 3 个质量浓度的质控样品各 5 份, 按 2.4 项下方法处理后进样测定。日内进样 5 次, 日间连

续测定 3 d, 并与标准曲线同时进样, 计算样品的实测质量浓度, 与配制质量浓度比较, 计算准确度和精密度, 结果见表 3。日内、日间精密度 RSD 值均小于 10.11%, 准确度在 92.55%~105.01%。

表 3 精密度试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Results of precision test ($n=5$)

| 成分 | 理论质量浓度/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$ | 日内精密度 | | | 日间精密度 | | |
|-----------|---|--|-------|-------|--|-------|-------|
| | | 实测质量浓度/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$ | RSD/% | RE/% | 实测质量浓度/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$ | RSD/% | RE/% |
| 大黄酸 | 10 | 10.20 | 6.16 | 2.00 | 9.65 | 7.95 | -3.50 |
| | 100 | 97.72 | 5.15 | -2.28 | 94.55 | 3.40 | -5.45 |
| | 1 000 | 1008.40 | 5.74 | 0.80 | 1 032.67 | 4.83 | 3.26 |
| 大黄素 | 10 | 10.11 | 4.67 | 1.10 | 9.32 | 7.98 | -6.80 |
| | 100 | 103.24 | 1.78 | 3.24 | 92.55 | 10.11 | -7.45 |
| | 1 000 | 981.80 | 1.87 | -1.82 | 983.94 | 2.35 | -1.60 |
| 芦荟大 黄素 | 10 | 9.68 | 5.06 | -3.20 | 9.54 | 6.10 | -4.60 |
| | 100 | 98.08 | 4.79 | -1.92 | 97.47 | 5.30 | -2.53 |
| | 1 000 | 992.40 | 2.88 | -0.79 | 997.17 | 3.74 | -0.28 |
| 大黄酚 | 10 | 9.42 | 2.79 | -5.80 | 9.77 | 6.55 | -2.30 |
| | 100 | 94.76 | 5.35 | -5.24 | 95.60 | 6.79 | -4.40 |
| | 1 000 | 963.24 | 3.06 | -3.67 | 963.84 | 6.36 | -3.61 |
| 大黄素 甲醚 | 10 | 9.31 | 4.37 | -6.90 | 9.89 | 8.42 | -1.10 |
| | 100 | 96.66 | 7.10 | -3.34 | 96.90 | 4.93 | -3.10 |
| | 1 000 | 985.20 | 2.77 | -1.48 | 1 037.00 | 7.51 | 3.70 |
| 番泻苷 A | 100 | 98.66 | 6.70 | -1.34 | 94.39 | 4.33 | -5.61 |
| | 500 | 514.20 | 6.84 | 2.84 | 490.91 | 6.30 | -1.81 |
| | 2 000 | 2100.12 | 4.29 | 5.01 | 2 090.40 | 2.09 | 4.52 |

2.8 稳定性试验

制备低、中、高 3 个质量浓度的质控样品各 5 份, 充分解冻后再次冷冻, 每次冻融间隔 24 h, 反复冻融 3 次以及在室温下 6 h, 按 2.4 项下方法处理

并测定, 考察质控样品的反复冻融稳定性, 结果见表 4。结果显示, 待测物血浆样品经历反复冻融 3 次及室温放置 6 h 后, RSD 值均小于 7.68%, 表明在上述条件下, 6 种成分在血浆样品中稳定性良好。

表 4 稳定性试验结果
Table 4 Results of stability samples

| 成分 | 理论质量浓度/ (ng·mL ⁻¹) | 3 次冻融 | | 室温下 6 h | |
|-------|-----------------------------------|-------------------------------|-------|-------------------------------|-------|
| | | 实测质量浓度/(ng·mL ⁻¹) | RSD/% | 实测质量浓度/(ng·mL ⁻¹) | RSD/% |
| 大黄酸 | 10 | 9.41±0.1 | 1.06 | 10.09±0.2 | 1.98 |
| | 100 | 95.72±9.3 | 9.71 | 101.3±8.0 | 7.89 |
| | 1 000 | 928.20±19.2 | 2.06 | 1 089.02±19.2 | 1.76 |
| 大黄素 | 10 | 9.71±0.2 | 2.06 | 10.20±0.6 | 5.88 |
| | 100 | 102.04±8.5 | 8.33 | 98.03±14.7 | 14.99 |
| | 1 000 | 981.80±21.2 | 2.16 | 1 082.01±105.4 | 9.74 |
| 芦荟大黄素 | 10 | 9.88±0.3 | 3.07 | 10.09±0.4 | 3.96 |
| | 100 | 96.19±7.6 | 7.90 | 98.04±5.5 | 5.61 |
| | 1 000 | 952.50±18.3 | 1.92 | 1 081.06±10.5 | 0.91 |
| 大黄酚 | 10 | 8.82±0.4 | 4.53 | 9.27±0.5 | 5.39 |
| | 100 | 92.58±6.5 | 7.02 | 96.40±19.2 | 19.91 |
| | 1 000 | 903.20±17.1 | 1.89 | 1 078.02±16.1 | 14.93 |
| 大黄素甲醚 | 10 | 8.91±0.2 | 2.24 | 10.50±0.4 | 3.81 |
| | 100 | 89.66±3.5 | 3.90 | 96.45±3.5 | 3.63 |
| | 1 000 | 905.20±18.1 | 20.18 | 1 036.20±17.1 | 1.65 |
| 番泻苷 A | 100 | 90.66±5.5 | 6.06 | 100.20±0.9 | 0.90 |
| | 500 | 454.20±10.2 | 2.24 | 526.20±23.7 | 4.50 |
| | 2 000 | 1 860.40±12.4 | 6.66 | 2 166.02±16.9 | 0.78 |

2.9 提取回收率和基质效应

将 6 份不同来源的大鼠空白血浆, 按以下方法处置: (1) 按 2.4 项下方法分别制备含大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚和番泻苷 A 的低、中、高 3 个质量浓度的标准血浆样品, 每个质量浓度平行制备 5 份, 进样分析; (2) 将空白血浆按 2.4 项下方法处理至氮气流吹干, 加入含大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚和番泻苷 A 的低、中、高 3 个质量浓度的混合对照品工作液和复溶剂, 溶解残渣, 离心后取上清液进样分析; (3) 以等量超纯水代替血浆样品, 按“(2)”中方法制备后进样分析。结果显示, 在低、中、高 3 个质量浓度下 6 种成分的提取回收率为 88.22%~102.04%, 基质效应为 89.26%~106.01%, 表明大鼠血浆生物基质不影响样品测定。结果见表 5。

2.10 药动学试验

取 SD 大鼠 18 只, 随机分为 3 组, 分别 ig 37.5、75、150 mg/kg 大黄蒽醌, 分别于给药后 0、0.083、0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、6、8、12、24 h 自大鼠眼眶静脉丛取血, 肝素抗凝, 4 000 r/min 离心 5 min, 移取上层血浆, 采用 HPLC-MS/MS 法测定血药浓度, 绘制血药浓度-时间曲线, 见图 2。采用 WinNonlin 软件进行数据分析, 计算药动学参数, 见表 6。在 37.5 mg/kg 剂量组中, 仅检测到大黄酸、大黄素和芦荟大黄素, 此 3 种成分可作为该低剂量组的药动学标志物; 在 75、150 mg/kg 剂量组中, 检测到大黄酸, 大黄素, 芦荟大黄素和大黄酚, 此 4 种成分可作为中、高剂量组的药动学标志物。在 3 个剂量组中均未检测到大黄素甲醚和番泻苷 A。大黄酸在体内迅速吸收, 3 个剂量组中均在 30 min 内

就达到最大血药浓度 (C_{max}), 而另外 3 个蒽醌类成分大黄素、芦荟大黄素和大黄酚的达峰时间 (t_{max}) 则相对较长, 均大于 1.8 h。大黄酸、大黄素、芦荟大黄素和大黄酚的半衰期 ($t_{1/2}$) 均大于 5 h。 C_{max}

和曲线下面积 ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$) 均随剂量的增加而增加, 具有剂量相关性。血浆清除率 (CL/F) 和表观分布容积 (V/F) 不随剂量增加而明显改变, 此 4 个成分药动学标志物的药动学行为呈线性动力学特征。

表 5 回收率和基质效应结果
Table 5 Results of matrix effect

| 成分 | 理论质量浓度/(ng·mL ⁻¹) | 提取回收率/% | 基质效应/% |
|-------|-------------------------------|---------|--------|
| 大黄酸 | 10 | 94.14 | 106.01 |
| | 100 | 95.72 | 97.72 |
| | 1 000 | 92.82 | 96.42 |
| 大黄素 | 10 | 97.06 | 101.06 |
| | 100 | 102.04 | 104.40 |
| | 1 000 | 98.18 | 98.18 |
| 芦荟大黄素 | 10 | 98.84 | 100.84 |
| | 100 | 96.19 | 104.08 |
| | 1 000 | 95.25 | 99.24 |
| 大黄酚 | 10 | 88.22 | 90.62 |
| | 100 | 92.58 | 90.58 |
| | 1 000 | 90.32 | 89.32 |
| 大黄素甲醚 | 10 | 89.06 | 91.06 |
| | 100 | 89.66 | 89.26 |
| | 1 000 | 90.52 | 90.52 |
| 番泻苷 A | 100 | 90.66 | 92.66 |
| | 500 | 90.84 | 93.84 |
| | 2 000 | 93.02 | 93.40 |

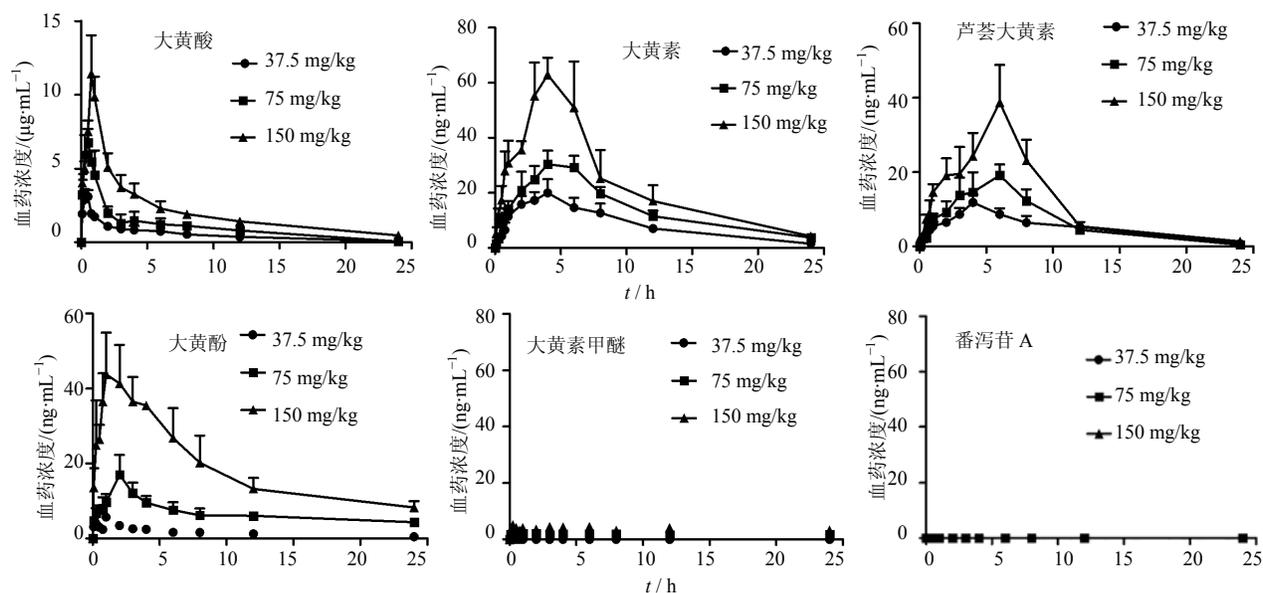


图 2 大鼠血浆中 6 种大黄蒽醌的血药浓度-时间曲线图

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves of six rhubarb anthraquinones in plasma of rats

表6 给予3个剂量的大黄蒽醌后大鼠体内药动学参数

Table 6 Pharmacokinetic parameters of rhubarb anthraquinones at three doses in rats

| 成分 | 参数 | 单位 | 37.5 mg/kg 剂量组 | 75 mg/kg 剂量组 | 150 mg/kg 剂量组 |
|-------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 大黄酸 | C_{max} | $ng \cdot mL^{-1}$ | $3\ 338.3 \pm 525.0$ | 7104.6 ± 980.7 | $13\ 077.2 \pm 615.8$ |
| | t_{max} | h | 0.38 ± 0.14 | 0.40 ± 0.14 | 0.40 ± 0.13 |
| | $t_{1/2}$ | h | 6.20 ± 1.07 | 6.43 ± 1.28 | 6.23 ± 1.27 |
| | $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ | $h \cdot ng \cdot mL^{-1}$ | $15\ 888.2 \pm 2\ 822.6$ | $29\ 606.9 \pm 3\ 908.4$ | $60\ 596.1 \pm 4\ 808.1$ |
| | CL/F | $L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$ | 0.80 ± 0.16 | 0.87 ± 0.20 | 0.90 ± 0.11 |
| | V/F | $L \cdot kg^{-1}$ | 8.02 ± 0.90 | 8.22 ± 1.36 | 8.51 ± 0.80 |
| 大黄素 | C_{max} | $ng \cdot mL^{-1}$ | 22.84 ± 3.37 | 32.10 ± 3.50 | 70.47 ± 9.71 |
| | t_{max} | h | 4.00 ± 0.00 | 3.80 ± 0.45 | 3.80 ± 0.45 |
| | $t_{1/2}$ | h | 6.32 ± 1.03 | 6.10 ± 0.64 | 6.42 ± 0.94 |
| | $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ | $h \cdot ng \cdot mL^{-1}$ | 297.3 ± 20.5 | 458.8 ± 57.9 | 870.3 ± 128.2 |
| | CL/F | $L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$ | 33.68 ± 2.74 | 39.77 ± 3.89 | 41.45 ± 4.93 |
| | V/F | $L \cdot kg^{-1}$ | 365.1 ± 29.5 | 399.7 ± 49.1 | 422.1 ± 67.7 |
| 芦荟大黄素 | C_{max} | $ng \cdot mL^{-1}$ | 10.74 ± 2.29 | 21.11 ± 2.93 | 36.86 ± 2.63 |
| | t_{max} | h | 5.60 ± 0.89 | 5.60 ± 0.89 | 6.00 ± 0.00 |
| | $t_{1/2}$ | h | 5.33 ± 0.35 | 5.49 ± 0.67 | 5.66 ± 0.84 |
| | $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ | $h \cdot ng \cdot mL^{-1}$ | 164.6 ± 26.5 | 306.9 ± 28.9 | 536.7 ± 62.6 |
| | CL/F | $L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$ | 31.65 ± 1.94 | 33.47 ± 0.73 | 36.79 ± 2.16 |
| | V/F | $L \cdot kg^{-1}$ | 298.4 ± 34.7 | 331.5 ± 42.7 | 357.6 ± 47.8 |
| 大黄酚 | C_{max} | $ng \cdot mL^{-1}$ | — | 18.17 ± 3.55 | 46.92 ± 3.00 |
| | t_{max} | h | — | 1.80 ± 0.45 | 1.80 ± 0.45 |
| | $t_{1/2}$ | h | — | 8.22 ± 0.56 | 8.54 ± 1.00 |
| | $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ | $h \cdot ng \cdot mL^{-1}$ | — | 232.1 ± 23.3 | 476.7 ± 63.4 |
| | CL/F | $L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$ | — | 5.25 ± 1.04 | 5.43 ± 0.86 |
| | V/F | $L \cdot kg^{-1}$ | — | 78.70 ± 7.41 | 80.74 ± 5.28 |

3 讨论

本研究建立了 HPLC-MS/MS 同时检测大鼠血浆中 6 种蒽醌类成分的方法, 改进了以往文献较多采用的 HPLC-UV 检测方法^[5], 降低血浆样品中杂质的干扰, 提高了检测灵敏度。同时改进了血浆处理方法, 不使用直接沉淀蛋白法^[6]或固相萃取法^[9], 而采用醋酸乙酯液液萃取法, 可避免血浆样品中杂质对色谱柱和质谱检测器的污染, 提高大黄蒽醌类成分的回收率, 也能降低提取成本。

在药动学研究中, 大黄酸在大鼠血浆中的浓度能达到微克级, 而大黄素、芦荟大黄素和大黄酚的仅达纳克级。这可能是由于大黄酸在大黄蒽醌提中含量最高(42.95%), 而另外 3 个成分含量较低(分别为 26.72%、14.69%、1.5%)。且大黄素和芦荟大黄素能在体内被氧化并转化为大黄酸, 然而还没有

证据表明大黄酸能够减少大黄素或芦荟大黄素的转化^[10]。大黄素甲醚因在提取物中含量较低(0.49%), 故未在大鼠血浆样品中检测到。番泻苷 A 在大黄蒽醌中质量分数为 3.91%, 虽高于大黄酚(1.5%)和大黄素甲醚(0.49%), 但在大鼠血浆样品中也未检测到其原型成分, 原因可能是由于番泻苷 A 以结合型蒽醌的形式存在, 是大黄蒽醌类衍生物以及蒽醌与葡萄糖结合形成的苷类, 其在体内能被 β -葡萄糖苷酶代谢为蒽醌, 再氧化得到其苷元大黄酸^[11-12]。因此, 这在一定程度上增加了大鼠体内大黄酸浓度。

综上, 本研究建立了同时测定大鼠血浆中 6 种大黄蒽醌类成分的 HPLC-MS/MS 方法, 可以高效、准确地测定血浆样品中蒽醌类成分的浓度, 且适用于大黄蒽醌在大鼠体内的药动学研究, 为药动学标志物的研究以及临床指导用药提供参考。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 23-24.
- [2] 丁玉玲. 大黄蒽醌类的研究概况 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(11), 1160-1162.
- [3] Tang W F, Huang X, Yu Q, *et al.* Determination and pharmacokinetic comparison of rhein in rats after oral dosed with Da-Cheng-Qi decoction and Xiao-Cheng-Qi decoction [J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21(11), 1186- 1190.
- [4] Hou M L, Chang L W, Lin C H, *et al.* Determination of bioactive components in Chinese herbal formulae and pharmacokinetics of rhein in rats by UPLC-MS/MS [J]. *Molecules*, 2014, 19(4): 4058-4075.
- [5] 王新宏, 范广平, 安睿, 等. 大鼠血浆中大黄蒽醌甙元的 HPLC 分析方法学研究 [J]. 中成药, 1997, 19(1): 37-39.
- [6] Lee J H, Kim J M, Kim C. Pharmacokinetic analysis of rhein in *Rheum undulatum* L. [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 84(1): 5-9.
- [7] Zhang Y X, Li J S, Peng W W, *et al.* Comparative pharmacokinetics of aloe-emodin, rhein and emodin determined by liquid chromatography-mass spectrometry after oral administration of a rhubarb peony decoction and rhubarb extract to rats [J]. *Pharmazie*, 2013, 68(5): 333-339.
- [8] Gong H, Tang W, Wang H, *et al.* Effects of food and gender on the pharmacokinetics of rhein and emodin in rats after oral dosing with Da-Cheng-Qi decoction [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(1): 74-80.
- [9] 徐会平, 冯素香, 李建生, 等. SPE-HPLC 法测定大鼠血浆中的大黄素及药物动力学研究 [J]. 中成药, 2011, 33(7): 1230-1232.
- [10] Krumbiegel G, Schulz H U. Rhein and aloe-emodin kinetics from senna laxatives in man [J]. *Pharmacology*, 1993, 47(Suppl 1): 120-124.
- [11] De Witte P. Metabolism and pharmacokinetics of anthranoids [J]. *Pharmacology*, 1993, 47(Suppl 1): 86-97.
- [12] Kon R, Ikarashi N, Nagoya C, *et al.* Rheinanthrone, a metabolite of sennoside A, triggers macrophage activation to decrease aquaporin-3 expression in the colon, causing the laxative effect of rhubarb extract [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 152(1): 190-200.