

基于 UPLC-MS/MS 大承气汤多种活性成分大鼠体内药动学研究

姜 丽, 余兰彬, 张启云, 尚广彬, 余文燕, 单 思, 徐国良*

江西中医药大学 江西省中医病因生物学重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法 (UPLC-MS/MS), 研究大鼠 ig 大承气汤后芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、和厚朴酚及厚朴酚 10 种有效成分的体内药动学过程。**方法** 大鼠 ig 大承气汤 (10.35 g/kg) 后, 于不同时间点从眼底静脉丛取血, 以 1,8-二羟基蒽醌为内标, 血浆样品前处理后进行 UPLC-MS/MS 分析。以甲醇-0.1%甲酸为流动相梯度洗脱, 色谱柱为岛津 Shim-pack XR-ODS III (75 mm×2.0 mm, 1.6 μm), 体积流量 0.35 mL/min, 采用电喷雾离子化 (ESI) 源, 负离子模式扫描, 多反应监测模式 (MRM) 检测各有效成分; 采用 WinNonlin 4.1 药动学软件计算药动学参数。**结果** 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、和厚朴酚、厚朴酚 10 种有效成分质量浓度分别在 0.52~520.00、2.06~616.00、0.57~568.00、3.1~1 240.0、18.5~1 000.0、1.94~972.00、1.59~796.00、1.63~816.00、0.025~50.000、0.027~53.300 ng/mL 线性关系良好。各成分精密度、回收率良好, 且在整个分析过程中稳定, 均符合生物样品分析要求。给药大鼠血浆中大黄素甲醚大多数点血药浓度低于检测限, 未能得到药动学参数; 其他成分均得到完整的血药浓度-时间曲线和药动学参数。**结论** 该方法可用于同时测定大承气汤中多种有效成分的血药浓度, 可用于药动学研究, 且方法准确。

关键词: 大承气汤; 药动学; UPLC-MS/MS; 芦荟大黄素; 大黄酸; 大黄素; 大黄酚; 大黄素甲醚; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; 和厚朴酚; 厚朴酚

中图分类号: R285.51 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)19-2908-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.19.015

In vivo pharmacokinetic study on several active components of Dachengqi Decoction in rats by UPLC-MS/MS

JIANG Li, YU Lan-bin, ZHANG Qi-yun, SHANG Guang-bin, YU Wen-yan, SHAN Si, XU Guo-liang

Research Center for Differentiation and Development of TCM Basic Theory, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To study the *in vivo* pharmacokinetics of aloe emodin, rhein, emodin, chrysophanol, physcion, hesperidin, neohesperidin, naringin, honokiol, and magnolol in plasma of rats after ig administration of Dachengqi Decoction. **Methods** After ig administration of Dachengqi Decoction (10.35 g/kg), the blood was collected from the retinal vein plexus of rats at predetermined time and pre-prepared with 1,8-dihydroxyanthraquinone as internal standard (IS). A reliable ESI source, negative ion mode scanning, and multiple reaction monitoring (MRM) method were developed for the simultaneous determination of the active components in Dachengqi Decoction and chromatography was carried out on a Shimadzu Shim-pack XR-ODS III (75 mm × 2.0 mm, 1.6 μm) using a gradient mobile phase consisted of methanol and 0.1% formic acid water at a flow rate of 0.35 mL/min. Calculations of the pharmacokinetic data were performed using WinNonlin 4.1 software. **Results** Calibration curves for aloe emodin, rhein, emodin, chrysophanol, physcion, hesperidin, neohesperidin, naringin, honokiol, and magnolol in plasma of rats were linear within the ranges of 0.52—520.00, 2.06—616.00, 0.57—568.00, 3.1—1 240.0, 18.5—1 000.0, 1.94—972.00, 1.59—796.00, 1.63—816.00, 0.025—50.000, and 0.027—53.300 ng/mL, respectively. The precision, recovery, and stability of each component in the present assay were acceptable for the analysis. They are in the line with the requirements of biological sample analysis. The concentration of physcion in plasma of rats was under the limit of detection at almost every time point, thus we failed to obtain the pharmacokinetic parameters of it. While the plasma concentration and pharmacokinetic parameters of other components were successfully calculated. **Conclusion** The proposed method can be used for the simultaneous determination of the concentration of several active components in plasma of rats and successfully applied to the

收稿日期: 2015-02-05

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973”) 基金资助项目 (2010CB530603)

作者简介: 姜 丽, 女, 博士, 讲师, 主要从事中药药动学研究。Tel: 15270034170 E-mail: jiangli1009@126.com

*通信作者 徐国良, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药药理及药动学研究。Tel: (0791)87118576 E-mail: xuguoliang6606@126.com

pharmacokinetic study of the analytes in rats after ig administration of Dachengqi Decoction.

Key words: Dachengqi Decoction; pharmacokinetics; UPLC-MS/MS; aloe emodin; rhein; emodin; chrysophanol; physcion; naringin; hesperidin; neohesperidin; honokiol; magnolol

大承气汤出自张仲景的《伤寒论》，由大黄、芒硝、枳实、厚朴4味药物组成，为寒下剂的代表方，主治阳明腑实证，热结旁流，里热实证之热厥、痉病或发狂，应用历史悠久^[1-2]。大黄素、大黄酚等蒽醌类成分为大黄的泻下有效成分^[3]；芒硝所含 Na_2SO_4 不被肠黏膜吸收而形成高渗溶液，增加肠内容，引起机械性刺激，致排稀便；枳实中的柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷等黄酮苷在调血脂、抗氧化、抗肿瘤等方面具有较强的生物活性^[4]。厚朴中厚朴酚具有抗病原微生物和调整胃肠运动等作用^[5]。这些成分既是大承气汤的物质基础，也是质量控制常用的指标物^[6]。已有研究建立了大承气汤中蒽醌类^[7-9]、黄酮类^[10-11]及木脂素类成分^[12-13]的体内分析方法，但均仅针对一类成分；肖秋元等^[14]采用HPLC-DAD指纹图谱法研究了大承气汤血清药物化学，初步阐明血中移行成分的来源，但只能一定程度上揭示血中部分特定物质代谢行为的变化特点，对于血清中各活性成分并未进行定量。本研究考虑到芒硝指标性成分硫酸根离子在血浆中几乎测不到，枳实中辛弗林在血样中亦无法检测，故未将二者列入测定指标。本研究首次采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)，建立了同时测定大承气汤中包括大黄蒽醌类成分(芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚)、枳实黄酮类成分(柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷)及厚朴木脂素类成分(和厚朴酚、厚朴酚)3大类10种有效成分的体内分析方法，并应用于大承气汤在大鼠体内药动学研究，为大承气汤的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 药品与试剂

按大承气汤临床中剂量组方：大黄36 g、厚朴27 g、枳实27 g、芒硝13.5 g，加入方药总量8倍水，温水浸泡30 min，回流提取，至沸腾时计时，煮沸40 min，滤过，浓缩至生药质量浓度1 g/mL，即得大承气汤水煎液[含有芦荟大黄素0.035 5 μg/mL、大黄酸6.702 μg/mL、大黄素0.988 μg/mL、大黄酚1.846 μg/mL、大黄素甲醚(未测到)、柚皮苷5.509 μg/mL、橙皮苷0.978 μg/mL、新橙皮苷1.668 μg/mL、和厚朴酚0.0589 μg/mL、厚朴酚0.057 μg/mL]；对照品柚皮苷(质量分数>98%，批号10552-201301，

南昌贝塔生物科技有限公司)；对照品橙皮苷(批号130122)、新橙皮苷(批号130510)、芦荟大黄素(批号130327)、大黄酸(批号130325)、大黄素(批号10103-201305)、大黄酚(批号130418)、大黄素甲醚(批号140115)、和厚朴酚(批号130328)、厚朴酚(批号130325)、1,8-二羟基蒽醌(内标，批号130328)，质量分数均>98%，四川省维克奇生物科技有限公司；乙腈(色谱纯，Fisher Scientific)；Milli-Q去离子水；其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

AB Q-TRAP 5500 三重四极杆液质联用仪(美国AB SCIEX公司)；KQ-300VDE型数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司)；BS110S型万分之一电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)；Milli-Q超纯水仪(美国Milipore公司)；TGL-16C台式离心机(上海安亭科学仪器厂)；VORTEX-5涡旋混合仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)；DN-24W水浴氮吹仪(上海比朗仪器制造有限公司)。

1.3 实验动物

清洁级雄性SD大鼠，体质量(250±20) g，购于北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证号SCXK(京)2012-0001。

2 方法

2.1 UPLC-MS/MS条件

2.1.1 色谱条件 岛津LC-30AD液相色谱(DGU-20A_{5R}脱气机、SIL-30AC自动进样器、CTO-30A柱温箱)-AB 5500系列三重四极杆质谱联用仪(数据采集和处理软件为Analyst 1.6.2工作软件)；采用岛津Shim-pack XR-ODS III色谱柱(75 mm×2.0 mm，1.6 μm)，以甲醇(A)-0.1%甲酸(B)为流动相，梯度洗脱程序：0~3.5 min，40% A；3.5~4.0 min，40%~80% A；4.0~10.0 min，80% A；10.0~11.0 min，80%~40% A；11.0~15.0 min，40% A，体积流量0.35 mL/min；进样量2 μL；柱温40℃。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子化(ESI)负离子模式扫描，多反应监测模式(MRM)测定；主要质谱参数为喷雾电压(IS)-4 500 V，离子源温度(TEM)500℃；雾化气(GS1)344.75 kPa(50 psi)；辅助加热器(GS2)344.75 kPa(50 psi)；气帘气(CUR)

137.9 kPa (20 psi); 入口电压 (EP) -10 V; 碰撞室出口电压 (CXP): -17 V; 碰撞气 (CAD) 48.265 kPa (7 psi); 各成分及内标的离子对及优化后的去簇电压 (DP) 和碰撞能 (CE) 参数值见表 1。

表 1 各被测成分优化的 MRM 检测模式参数

Table 1 MRM parameters of each component tested

成分	母离子→子离子(<i>m/z</i>)	DP/V	CE/eV
芦荟大黄素	269.0→240.0	-161	-29
大黄酸	283.1→239.0	-58	-19
大黄素	269.0→225.0	-164	-38
大黄酚	253.1→225.0	-193	-37
大黄素甲醚	283.1→240.0	-160	-40
柚皮苷	579.2→271.0	-160	-40
橙皮苷	609.2→301.1	-230	-33
新橙皮苷	609.2→301.0	-160	-60
和厚朴酚	265.1→224.0	-179	-30
厚朴酚	265.1→247.0	-148	-29
1,8-二羟基蒽醌	239.0→211.0	-160	-38

2.2 对照品储备液和工作溶液配制

分别精密称取一定量的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、和厚朴酚、厚朴酚、1,8-二羟基蒽醌 (内标), 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度分别为 52.0、61.6、56.8、124.0、40.0、97.2、79.6、81.6、100.0、160.0、58.8 $\mu\text{g/mL}$ 的各对照品储备液。

将各对照品储备液分别用甲醇稀释配制成 5.2~5 200.0、20.6~6 160.0、5.7~5 680.0、31~12 400、185~10 000、19.4~9 720.0、15.9~7 960.0、16.30~8 160.00、0.25~500.00、0.27~533.00 ng/mL 的工作溶液, 内标 1,8-二羟基蒽醌用甲醇稀释配成 5.88 $\mu\text{g/mL}$ 工作溶液。

2.3 标准曲线血浆样品及质控样品的制备

2.3.1 标准曲线血浆样品的制备 分别精密吸取“2.2”项中 10 个成分和内标工作溶液各 10 μL , 挥干溶剂后, 加入空白血浆 100 μL , 涡旋 30 s, 配制芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、和厚朴酚、厚朴酚分别为 0.52~520.00、2.06~616.00、0.57~568.00、3.1~1240.0、18.5~1 000.0、1.94~972.00、1.59~796.00、1.63~816.00、0.025~50.000、0.027~53.300 ng/mL 标准曲线血浆样品。

2.3.2 质控样品的制备 用于标准质控血浆样品配制同“2.3.1”项, 其中芦荟大黄素质控样品为 1.04、260.00、416.00 ng/mL , 大黄酸为 4.12、61.60、492.80

ng/mL , 大黄素为 1.14、284.00、454.40 ng/mL , 大黄酚为 6.2、77.5、992.0 ng/mL , 大黄素甲醚为 37、500、800 ng/mL , 柚皮苷为 3.88、486.00、777.60 ng/mL , 橙皮苷为 3.18、398.00、636.80 ng/mL , 新橙皮苷为 3.26、408.00、652.80 ng/mL , 和厚朴酚为 0.05、25.00、40.00 ng/mL , 厚朴酚为 0.054、26.700、42.600 ng/mL 。

2.4 药动力学实验

2.4.1 血浆样品制备及处理 大鼠 6 只, 自由饮水, 给药前禁食 12 h, ig 给予大承气汤 10.35 g/kg (相当于生药剂量)。分别于给药后 0.083、0.25、0.5、1、1.5、2、4、6、8、12 h 眼底静脉丛从毛细管取血约每只 0.3 mL, 肝素钠抗凝, 13 000 r/min 离心 10 min, 分离上层血浆, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

冻血浆室温下融化后, 在多管涡旋器上涡旋 30 s。精密吸取血浆 100 μL 置 1.5 mL 尖底 EP 管中, 加入内标 1,8-二羟基蒽醌 10 μL (5.880 $\mu\text{g/mL}$)、甲醇 0.4 mL, 涡旋振荡 1 min, 13 000 r/min 离心 10 min 以沉淀蛋白, 将上清液全部转移至另一 EP 管中, 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下于 N_2 吹干仪上挥干, 残渣用 100 μL 甲醇-0.1%甲酸 (1:1) 复溶, 涡旋振荡 1 min 后于 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2 μL 进样, 进行 UPLC-MS/MS 分析。

2.4.2 样品测定 在“2.1”项液质条件下进样, 测定血浆样品中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、和厚朴酚、厚朴酚的峰面积 (A_s) 和内标 1,8-二羟基蒽醌的峰面积 (A_i), 分别计算待测成分与内标物峰面积的比值 A_s/A_i , 带入随行的标准曲线计算样品中各成分的量。

2.4.3 药动力学参数计算 取“2.4.1”项血浆样品, 按照血浆样品处理方法处理, 在“2.1”项条件下进样测定, 将各组给药大鼠不同时刻血药浓度数据代入 WinNonlin 4.1 药动力学软件计算相应药动力学参数。

2.5 数据分析

血药浓度-时间数据采用 WinNonlin 4.1 药动力学软件按非房室模型处理, 计算药动力学参数, 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 专属性考察 取大鼠空白血浆、空白血浆+内标溶液、空白血浆+对照品+内标溶液、血浆样品, 按“2.4.1”项血样处理方法处理, 按照“2.1”项方法进样, 结果表明, 血浆的内源性物质不干扰各成分和内标的测定, 表明液质行为及专属性良好, 结果见图 1。

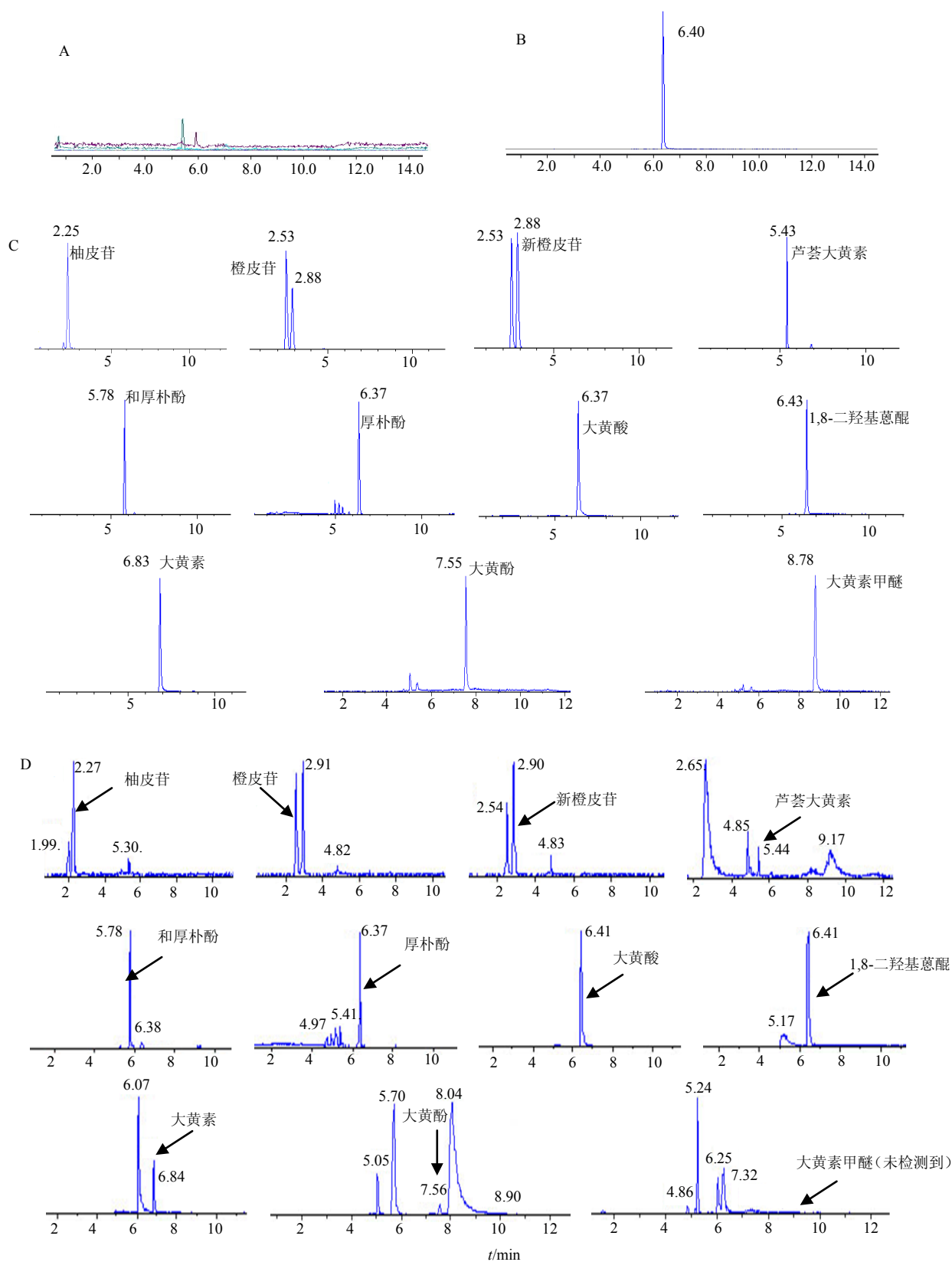


图 1 空白血浆 (A)、空白血浆+内标 (B)、空白血浆+各成分对照品+内标 (C) 和血浆样品+内标 (D) 提取离子色谱图

Fig. 1 Extract ion chromatogram of blank plasma (A), blank plasma + IS (B), blank plasma + each reference substance + IS (C), and plasma sample + IS (D)

3.1.2 标准曲线和线性范围 分别精密吸取“2.3.1”项各标准曲线血浆样品 100 μL , 按“2.4.1”项的方法处理, 在“2.1”项条件下进样测定, 记录色谱图。采用加权 ($1/X^2$) 最小二乘法, 以待测成分峰面积与内标峰面积的比值 (Y) 对样品质量浓度 (X) 进行曲线拟合回归, 得工作方程, 定量限以 $S/N \geq 10$ 计, 各成分线性方程结果见表 2, 表明各成分在相应的线性范围内线性良好。

3.1.3 基质效应 经“2.4.1”项方法预处理后的空白血浆样本中添加各成分低、中、高 3 个浓度的质控样品和内标, 在“2.1”项条件下进样测定, 所得峰面积 B , 与未经处理的各成分相应浓度的工作溶液峰面

积 A 的比值即 B/A 计算基质效应, 结果见表 3, 表明不同来源的血样对各成分 (低、中、高质量浓度) 和内标的响应信号的影响是一致的, 符合生物样品定量要求。

3.1.4 绝对回收率 配制各成分低、中、高 3 个浓度的质控样品 100 μL , 各 5 份, 按照“2.4.1”项的血样处理方法处理, 在“2.1”项条件下进样测定, 所得峰面积记为 C , 与未经处理的各成分相应浓度的工作溶液峰面积 A 的比值即 C/A 计算绝对回收率, 结果见表 3, 回收率大于 50%, 符合生物样品定量要求。

3.1.5 日内、日间精密度和准确度 (相对回收率) 配制各成分低、中、高 3 个质量浓度的质控样品

表 2 各成分线性方程及线性范围

Table 2 Linear equations and ranges of each component

成分	线性方程	r	线性范围/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	定量限/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
芦荟大黄素	$Y=1.65 \times 10^{-3} X+3.32 \times 10^{-3}$	0.997 6	0.52~520.00	0.52
大黄酸	$Y=6.47 \times 10^{-3} X+0.023 1$	0.998 9	2.06~616.00	2.06
大黄素	$Y=0.020 6 X+0.123$	0.996 6	0.57~568.00	0.57
大黄酚	$Y=7.37 \times 10^{-5} X+0.024 3$	0.999 0	3.1~1 240.0	3.1
大黄素甲醚	$Y=4.92 \times 10^{-5} X+4.36 \times 10^{-3}$	0.993 8	18.5~1 000.0	18.5
柚皮苷	$Y=5.02 \times 10^{-4} X+0.049$	0.995 0	1.94~972.00	1.94
橙皮苷	$Y=6.98 \times 10^{-4} X+0.034 1$	0.996 0	1.59~796.00	1.59
新橙皮苷	$Y=1.44 \times 10^{-3} X+0.133$	0.995 7	1.63~816.00	1.63
和厚朴酚	$Y=5.37 \times 10^{-3} X+4.17 \times 10^{-3}$	0.996 3	0.025~50.000	0.025
厚朴酚	$Y=5.98 \times 10^{-3} X+0.011 1$	0.995 8	0.027~53.300	0.027

表 3 各成分基质效应和绝对回收率

Table 3 Matrix effects and absolute recoveries of each component

成分	质量浓度/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	基质效应/%	绝对回收率/%	成分	质量浓度/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	基质效应/%	绝对回收率/%
芦荟大黄素	1.04	119.46 $\pm$ 5.01	81.23 $\pm$ 2.56	柚皮苷	3.88	112.96 $\pm$ 18.17	74.21 $\pm$ 2.00
	260.00	100.00 $\pm$ 3.49	88.88 $\pm$ 3.16		486.00	145.39 $\pm$ 3.85	77.67 $\pm$ 2.10
	416.00	100.00 $\pm$ 6.36	91.40 $\pm$ 4.27		777.60	139.83 $\pm$ 1.63	77.29 $\pm$ 3.03
大黄酸	4.12	85.14 $\pm$ 11.61	88.43 $\pm$ 3.43	橙皮苷	3.18	110.09 $\pm$ 5.81	67.52 $\pm$ 2.20
	61.60	94.77 $\pm$ 1.47	98.27 $\pm$ 4.77		398.00	92.90 $\pm$ 3.45	81.05 $\pm$ 3.45
	492.80	81.56 $\pm$ 3.56	99.04 $\pm$ 8.26		636.80	76.29 $\pm$ 2.61	87.99 $\pm$ 6.52
大黄素	1.14	81.16 $\pm$ 2.47	97.99 $\pm$ 3.35	新橙皮苷	3.26	119.46 $\pm$ 5.01	85.98 $\pm$ 1.42
	284.00	92.78 $\pm$ 2.98	104.93 $\pm$ 5.38		408.00	100.00 $\pm$ 3.49	82.32 $\pm$ 2.45
	454.40	84.22 $\pm$ 3.83	100.33 $\pm$ 3.00		652.80	100.00 $\pm$ 6.36	83.82 $\pm$ 2.09
大黄酚	6.2	65.62 $\pm$ 1.88	86.63 $\pm$ 7.91	和厚朴酚	0.05	85.09 $\pm$ 8.15	93.68 $\pm$ 8.33
	77.5	77.20 $\pm$ 2.13	88.07 $\pm$ 2.89		25.00	85.77 $\pm$ 2.20	93.06 $\pm$ 8.24
	992.0	71.06 $\pm$ 10.53	89.38 $\pm$ 8.75		40.00	71.44 $\pm$ 1.82	92.74 $\pm$ 4.43
大黄素甲醚	37	76.39 $\pm$ 6.57	91.61 $\pm$ 7.44	厚朴酚	0.054	81.53 $\pm$ 19.25	98.93 $\pm$ 6.19
	500	40.53 $\pm$ 3.28	93.05 $\pm$ 7.58		26.700	72.44 $\pm$ 2.17	100.85 $\pm$ 4.50
	800	58.57 $\pm$ 3.11	82.02 $\pm$ 5.75		42.600	60.76 $\pm$ 5.83	100.93 $\pm$ 6.27

100 μL , 每个浓度平行 5 份, 按照“2.4.1”项的血样处理方法处理, 在“2.1”项条件下进样测定, 每个样品测定 1 次, 于 1 批内完成, 计算日内精密度。分别在连续的不同日期制备各成分低、中、高 3 个质量浓度的质控样品各 5 份, 共进行 3 批次测定(共 45 个样本), 每批次随行一条标准曲线, 计算日间

精密度。将以上各个样品进样后所得峰面积与内标峰面积比值代入标准曲线回归方程计算质量浓度, 所得质量浓度与实际质量浓度的比值即为准确度(相对回收率)。结果表明, 各成分低、中、高 3 种质量浓度的日内/日间精密度均小于 15%, 准确度均大于 85%, 表明精密度与准确度良好, 结果见表 4。

表 4 各成分日内、日间精密度和准确度

Table 4 Intra-/inter-day precision and accuracy of each component

成分	质量浓度/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	精密度/%		准确度/%	
		日内	日间	日内	日间
芦荟大黄素	1.04	11.92	9.73	99.67 $\pm$ 11.88	103.94 $\pm$ 10.11
	260.00	4.15	11.78	112.00 $\pm$ 4.64	108.92 $\pm$ 12.83
	416.00	7.33	6.51	91.88 $\pm$ 6.74	92.39 $\pm$ 6.02
大黄酸	4.12	4.47	7.79	98.01 $\pm$ 4.38	103.59 $\pm$ 8.07
	61.60	8.06	7.04	99.77 $\pm$ 8.05	104.02 $\pm$ 7.32
	492.80	7.49	4.93	92.13 $\pm$ 6.90	93.06 $\pm$ 4.59
大黄素	1.14	3.25	11.59	104.39 $\pm$ 3.40	96.42 $\pm$ 11.17
	284.00	4.92	6.30	106.76 $\pm$ 5.25	105.33 $\pm$ 6.64
	454.40	9.17	6.91	94.37 $\pm$ 8.66	92.91 $\pm$ 6.42
大黄酚	6.2	4.55	6.26	107.03 $\pm$ 4.87	101.25 $\pm$ 6.34
	77.5	6.17	5.74	102.86 $\pm$ 6.35	105.27 $\pm$ 6.05
	992.0	7.38	6.97	96.94 $\pm$ 7.15	96.27 $\pm$ 6.71
大黄素甲醚	37	5.32	7.65	97.84 $\pm$ 5.21	105.48 $\pm$ 8.07
	500	4.07	7.96	97.76 $\pm$ 3.98	103.51 $\pm$ 8.24
	800	6.25	8.89	94.13 $\pm$ 5.88	100.25 $\pm$ 8.91
柚皮苷	3.88	6.42	6.70	102.58 $\pm$ 6.58	105.82 $\pm$ 7.10
	486.00	1.65	3.86	108.40 $\pm$ 1.79	110.11 $\pm$ 4.25
	777.60	1.46	6.99	91.70 $\pm$ 1.34	92.76 $\pm$ 6.49
橙皮苷	3.18	2.71	4.73	96.16 $\pm$ 2.61	101.32 $\pm$ 4.80
	398.00	3.05	5.77	108.34 $\pm$ 3.30	107.99 $\pm$ 6.23
	636.80	5.79	7.73	92.49 $\pm$ 5.36	96.21 $\pm$ 7.44
新橙皮苷	3.26	7.60	9.94	95.40 $\pm$ 7.25	101.84 $\pm$ 10.12
	408.00	3.90	6.36	105.54 $\pm$ 4.12	107.06 $\pm$ 6.80
	652.80	4.10	8.57	102.11 $\pm$ 4.19	98.17 $\pm$ 8.41
和厚朴酚	0.05	4.70	9.66	92.40 $\pm$ 4.34	97.68 $\pm$ 9.43
	25.00	3.15	5.64	104.96 $\pm$ 3.31	106.69 $\pm$ 6.01
	40.00	5.25	7.00	98.20 $\pm$ 5.16	96.38 $\pm$ 6.75
厚朴酚	0.054	13.51	9.20	98.22 $\pm$ 13.27	100.21 $\pm$ 9.21
	26.700	3.62	6.72	99.33 $\pm$ 3.60	106.49 $\pm$ 7.16
	42.600	5.95	6.26	91.92 $\pm$ 5.47	94.07 $\pm$ 5.89

3.1.6 样本稳定性考察 考察各成分低、中、高 3 个质量浓度的质控样品室温放置、自动进样器内、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 长期冷冻、冷冻-解冻 3 个循环等不同存储条件下的稳定性。结果表明, 血浆样品室温放置 4 h、血浆样品处理后在自动进样器内放置 24 h、血浆样

品冷冻-解冻循环 3 次、血浆样品长期冷冻于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内 30 d, 各成分的 RSD 均小于 15%。

3.2 平均血药浓度-时间曲线和药动学参数

各成分平均药时曲线见图 2, 药动学参数见表 5。由图 2 可知, 芦荟大黄素吸收基本呈单峰, 15 min

左右达峰；大黄酸吸收呈单峰，5 min 即达峰，吸收非常迅速；大黄素吸收呈双峰，15 min 左右有个吸收峰，8 h 有个宽吸收峰；大黄酚吸收呈单峰，达峰时间为 30 min；柚皮苷药时曲线呈双峰，30 min 出现 1 个较小的吸收峰，8 h 达最大吸收；橙

皮苷药时曲线呈大致双峰形态，但不如柚皮苷明显；新橙皮苷吸收与柚皮苷类似，呈双吸收峰，8 h 达最大吸收；和厚朴酚吸收基本呈单峰，15~30 min 达峰；厚朴酚吸收亦呈单峰，5~15 min 达峰。

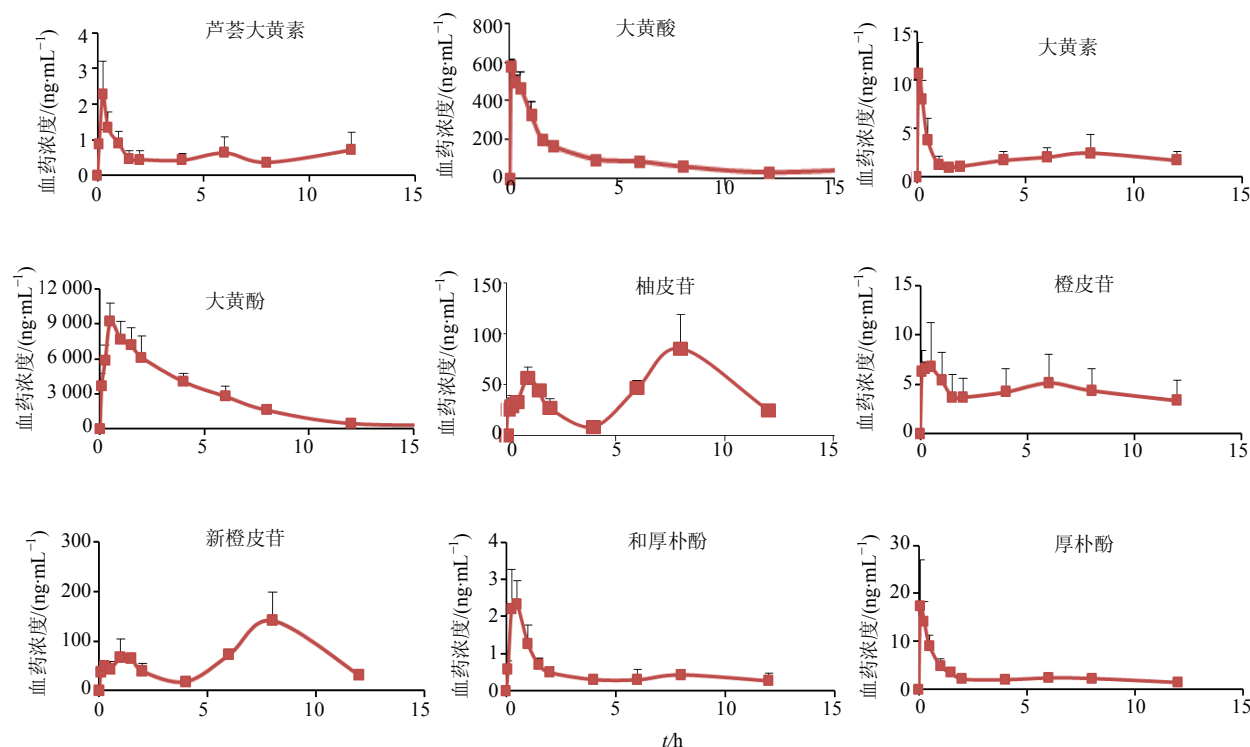


图2 各成分在大鼠血浆中的平均药时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Mean drug-time curves of each component in plasma of rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表5 大承气汤各成分在大鼠体内药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 *In vivo* pharmacokinetic parameters of each component in Dachengqi Decoction ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	单位	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	柚皮苷
$t_{1/2}$	h	7.35 ± 1.16	4.50 ± 0.81	9.80 ± 1.48	2.53 ± 0.38	5.41 ± 1.22
t_{max}	h	0.29 ± 0.09	0.08 ± 0	0.10 ± 0.06	0.56 ± 0.18	8 ± 0
C_{max}	$ng \cdot mL^{-1}$	3.53 ± 2.04	588.98 ± 37.85	10.70 ± 2.92	$9\ 186.48 \pm 1\ 642.11$	85.37 ± 40.88
$AUC_{0 \sim t}$	$ng \cdot h \cdot mL^{-1}$	8.40 ± 2.27	$1\ 386.06 \pm 180.02$	23.66 ± 8.35	$39\ 446.86 \pm 6\ 332.38$	520.97 ± 164.79
CL	$mL \cdot h^{-1}$	6.70 ± 2.17	11.23 ± 1.98	60.86 ± 28.21	0.12 ± 0.02	21.15 ± 5.94
$MRT_{0 \sim t}$	h	5.38 ± 1.09	3.41 ± 0.21	5.67 ± 0.52	3.58 ± 0.31	6.47 ± 0.35
参数	单位	橙皮苷	新橙皮苷	和厚朴酚	厚朴酚	
$t_{1/2}$	h	7.25 ± 1.11	3.38 ± 0.74	8.37 ± 2.50	6.03 ± 1.27	
t_{max}	h	0.53 ± 0.46	8 ± 0	0.39 ± 0.13	0.11 ± 0.07	
C_{max}	$ng \cdot mL^{-1}$	9.67 ± 2.23	141.17 ± 70.79	2.09 ± 1.05	21.04 ± 9.15	
$AUC_{0 \sim t}$	$ng \cdot h \cdot mL^{-1}$	54.37 ± 14.04	812.26 ± 279.34	5.5 ± 1.53	38.1 ± 10.18	
CL	$mL \cdot h^{-1}$	27.13 ± 8.04	4.68 ± 1.22	17.77 ± 6.36	3.07 ± 1.11	
$MRT_{0 \sim t}$	h	5.87 ± 0.61	6.56 ± 0.03	4.37 ± 1.42	4.34 ± 0.81	

4 讨论

大承气汤水煎液中未检测到大黄素甲醚,究其原因可能是本实验采用的是水提取法,对于 5 种游离型蒽醌中脂溶性最强的大黄素甲醚未能被提取出来,故在本实验提取方式下,血浆中未能检测到大黄素甲醚,这与许风国等^[15]的报道一致。

枳实中的柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷均属于二氢黄酮类,膜渗透性较差,体内生物利用度较低,且药时曲线均呈双吸收峰形态(双峰分别出现在 1 h 和 8 h 左右),有研究^[16-17]亦报道了柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的双峰现象,区别在于他们的研究是在 8 h 处出现一个稍低的吸收峰,推测由于大鼠个体吸收差异造成。双峰的产生表明有效成分可能进行了肝肠循环,即大承气汤被摄取后,可能以原型药物或代谢物分泌入胆汁,再由胆总管进入肠道,经肠道菌水解,其中一部分被肠道重吸收再次入肝,形成肝肠循环。其中柚皮苷、新橙皮苷 $t_{1/2}$ 分别为 (5.41 ± 1.22) 、 (3.38 ± 0.74) h,与曾令军等^[18]报道 (6.83 ± 0.21) 、 (4.38 ± 0.11) h 接近。

厚朴酚及和厚朴酚在大承气汤水煎液中测得量相近,但血浆中厚朴酚的 $C_{\max}$ 和 AUC 分别为和厚朴酚的 10 倍和 7 倍,表明血浆中主要以厚朴酚为主,和厚朴酚代谢较快,Wu 等^[13]和 Xu 等^[19]的研究结果也证实了这点。

有关大承气汤药动学研究多集中在某一类成分,且因影响因素较多,如给药形式、动物种属、给药途径及配伍等,故各成分药动学参数报道不一。本研究建立了同时测定 3 大类 10 种有效成分的体内分析方法,可较好为临床应用大承气汤提供科学依据。

参考文献

- [1] 巩昌真,刘一凡.难病奇方系列丛书第三辑——大承气汤[M].北京:中国医药科技出版社,2009.
- [2] 谢臻.大承气汤方药物质基础及其配伍规律研究[D].广州:广州中医药大学,2009.
- [3] 刘斌.中药成分体内代谢与分析研究[M].北京:中国中医药出版社,2011.
- [4] 刘学仁.柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的提取与分析研究[D].黄石:湖北师范学院,2011.
- [5] 阴健,郭力弓.中药现代研究与临床应用[M].北京:学苑出版社,1993.
- [6] 中国药典[S].一部.2010.
- [7] Tang W F, Yu Q, Wan M H, et al. Simultaneous determination and pharmacokinetic studies of aloe

- emodin and chrysophanol in rats after oral administration of Da-Cheng-Qi decoction by high-performance liquid chromatography [J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21(7): 701-707.
- [8] Yan D M, Ma Y M. Simultaneous quantification of five anthraquinones in rat plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21(5): 502-507.
- [9] 高峰,刘承萍,曹骋,等.大鼠体内大承气汤蒽醌成分的药代动力学研究[J].*中华中医药杂志*, 2011, 26(5): 1018-1021.
- [10] Fang T Z, Wang Y G, Ma Y, et al. A rapid LC/MS/MS quantitation assay for naringin and its two metabolites in rats plasma [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40(2): 454-459.
- [11] 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.
- [12] Sheng Y L, Xu J H, Shi C H, et al. UPLC-MS/MS-ESI assay for simultaneous determination of magnolol and honokiol in rat plasma: Application to pharmacokinetic study after administration emulsion of the isomer [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(3): 1568-1574.
- [13] Wu X N, Chen X G, Hu Z D. High-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of honokiol and magnolol in rat plasma [J]. *Talanta*, 2003, 59(1): 115-121.
- [14] 肖秋元.大承气汤的血清药物化学研究[D].成都:西南交通大学,2010.
- [15] 许风国,刘颖,宋瑞,等.LC-MS/MS 法研究大承气汤与其君药大黄物质基础间的相关性[J].*中国药科大学学报*, 2008, 39(2): 136-141.
- [16] 陈稚.枳实-白芍药对干预肝郁脾虚型 IBS 大鼠的配伍及药动学研究[D].广州:广州中医药大学,2014.
- [17] 李晓红,熊志立,卢姗,等.液质联用研究骨碎补提取物给予大鼠后柚皮苷及其代谢物柚皮素的药动学行为[J].*中国天然药物*, 2010, 8(1): 40-46.
- [18] 曾令军,陈丹,郑利,等.玳玳黄酮提取物特征活性成分不同生理状态的药动学特性比较[J].*中国中药杂志*, 2014, 39(2): 309-315.
- [19] Xu F G, Liu Y, Zhang Z J, et al. Rapid simultaneous quantification of five active constituents in rat plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry after oral administration of Da-Cheng-Qi decoction [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 47(3): 586-595.