

HPLC-MS 法测定大鼠体内大黄素血药浓度及药动学研究

冯素香^{1,2,3*}, 李蒙蒙^{1,2}, 李晨⁴, 李先贺^{1,2}, 王哲^{1,2}, 张蕾^{1,2}, 高宁宁^{1,2}

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046

2. 呼吸疾病诊疗与新药研发河南省高校协同创新中心, 河南 郑州 450046

3. 河南省中医药防治呼吸病重点实验室, 河南 郑州 450046

4. 赛默飞世尔科技(中国)有限公司 色谱质谱部, 上海 201206

摘要: **目的** 建立高效液相色谱/四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(HPLC-Q-HR/MS)方法, 研究大黄素在正常与脑缺血大鼠体内的药动学规律。**方法** 采用HPLC-Q-HR/MS内标法测定大黄素血药浓度, 色谱柱为XBridgeTM C₁₈柱(150 mm×2.1 mm, 5 μm), 柱温30℃; 流动相为3 mmol/L 乙酸铵-甲醇, 梯度洗脱, 梯度洗脱程序为0~2 min, 30%甲醇; 2~10 min, 30%~60%甲醇; 10~13 min, 60%~30%甲醇; 体积流量为0.3 mL/min; 进样体积为5 μL; 质谱条件: 离子源为加热电喷雾离子化源(HESI), 扫描方式为全扫模式, 负离子模式检测。以DAS 3.0软件拟合计算药动学参数。**结果** 大黄素在正常与脑缺血大鼠血浆中的主要药动学参数分别为AUC_{0-∞}(605.63±163.66)、(1 107.78±191.11) ng·h/mL, C_{max}(81.96±20.72)、(91.65±16.82) ng/mL, V_Z/F(851.03±97.30)、(1 051.87±119.88) L/kg, t_{1/2}(10.31±1.61)、(23.13±3.56) h, t_{max}(0.75±0.22)、(0.75±0.16) h。**结论** 该法操作简便、分析速度快、灵敏, 适用于大黄素在大鼠体内的药动学研究。

关键词: 大黄素; HPLC-MS; 高效液相色谱/四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱; 药动学; 脑缺血

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)10-1971-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.10.007

Determination of emodin in plasma by HPLC-MS and its pharmacokinetic study in rats

FENG Su-xiang^{1,2,3}, LI Meng-meng^{1,2}, LI Chen⁴, LI Xian-he^{1,2}, WANG Zhe^{1,2}, ZHANG Lei^{1,2}, Gao Ning-ning^{1,2}

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine Development of Henan Province, Zhengzhou 450046, China

3. Henan Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Disease, Zhengzhou 450046, China

4. Thermo Fisher Scientific (China) Co., Ltd., Shanghai 201206, China

Abstract: Objective To establish a method for determination of emodin in rat plasma by HPLC/Q-Exactive HR/MS, and to study the pharmacokinetics of emodin in normal rats and cerebral ischemia rats. **Methods** The plasma concentration of emodin was determined by HPLC/Q-Exactive HRMS method with internal standard method. Emodin was eluted on a XBridgeTM C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 5 μm) column with temperature at 30℃. The mobile phase consisted of 3 mmol/L ammonium acetate and methanol, with a gradient program as follows: 0~2 min (30% methanol), 2~10 min (30%~60% methanol), 10~13 min (60%~30% methanol). The flow rate was 0.3 mL/min, and the injection volume was 5 μL. MS experiments were coupled with the HPLC via HESI source operated in negative ionization full-scan mode. The pharmacokinetic parameters were calculated by the software of DAS 3.0. **Results** The main pharmacokinetic parameters of emodin in normal rats and cerebral ischemia rats were as follows: AUC_{0-∞} were (605.63±163.66) and (1 107.78±191.11) ng·h/mL, C_{max} were (81.96±20.72) and (91.65±16.82) ng/mL, V_Z/F were (851.03±97.30) and (1 051.87±119.88) L/kg, t_{1/2} were (10.31±1.61) and (23.13±3.56) h, t_{max} were (0.75±0.22) and (0.75±0.16) h. **Conclusion** The method is simple, accurate, fast, sensitive, and suitable for the pharmacokinetic study of emodin in rats.

Key words: emodin; HPLC-MS; HPLC-Q-HR/MS; pharmacokinetic; cerebral ischemia

收稿日期: 2017-04-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81274179); 河南省教育厅科学技术研究重点项目(14B360004)

作者简介: 冯素香(1971—), 女, 河南郑州人, 教授, 博士, 研究方向为中药质量分析与新药研究。

Tel: 13526403080 E-mail: fengsx221@163.com

脑缺血又称脑卒中,是以卒然昏仆、不省人事、伴口眼喎斜、半身不遂、语言不利等为主症的一种疾病,其具有发病率、致残率、病死率高等特点。据第3次中国死亡原因调查显示,其已超过了心血管疾病和恶性肿瘤,成为中国第一死亡疾病^[1]。其中80%左右为缺血性脑卒中,短暂或永久性脑血流量减少导致的缺血性脑卒中是目前主要的人类死亡原因,亦是致残的重要因素,故恢复脑血流灌注尤为重要^[2]。而研究发现,脑缺血后的血流恢复可引起脑组织及功能受损,即脑缺血再灌注损伤^[3]。脑缺血再灌注损伤是一个多种致病因子参与的复杂病理生理过程,损伤机制复杂,自由基和炎症与缺血再灌注损伤关系紧密^[4-5]。随着人口老龄化的到来,预防和治疗脑梗死并试图提高脑梗死的医疗质量是整个医学界迫切需要解决的问题^[6]。近年来学者们在中医药治疗缺血性脑血管疾病方面做了大量研究工作,从单味药到复方进行了广泛研究,从多种角度阐明了不同中药及方剂的作用机制,为临床治疗缺血性脑血管疾病提供了理论依据^[7]。

大黄是临床常用中药,药用历史悠久,始载于《神农本草经》,具有泻热通肠、凉血解毒、逐瘀通经之功效。其主要成分为大黄蒽醌类衍生物,如大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄酸、大黄素甲醚等^[8]。大黄素(emodin)属单蒽核类1,8-二羟基蒽醌衍生物,是大黄的有效成分之一。现代研究表明大黄素具有抗炎、免疫调节、抗病原微生物、保肝利胆、影响胃肠道运动、抗癌等药理作用^[9-10]。李建生等^[11-12]研究表明大黄苷元及其单体对脑缺血损伤后的炎性级联反应有关。严志康等^[13]证实了大黄能够减少脑缺血-再灌注损伤后的细胞凋亡,从而发挥其脑保护作用。

据文献报道,多种检测方法已用于大黄素定量测定。高峰等^[14]成功建立了HPLC-UV法测定大鼠口服大承气汤后其体内的大黄素等5种蒽醌类成分的药动学特性。Yan等^[15]建立HPLC-FLD法成功测定了大鼠口服泻心汤后其血浆中大黄素等5种蒽醌类成分,为泻心汤如何发挥药效提供了一定的科学解释。由于传统HPLC灵敏度低的缺点,近年来,高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS)技术^[16-18]得到了快速发展,宋增锋等^[19]利用高效液相色谱串联三重四级杆质谱测定大鼠大黄素血药浓度及其脑组织量,然而,三重四级杆质谱的分辨率比较低。最近,Q-Exactive质谱由于具有测定质量准确、分辨率高、

待测成分在较低浓度条件下可以进行定量测定的优势得到广泛的应用。本实验以大黄素为指标,建立高效液相色谱/四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(HPLC-Q-HR/MS)方法,测定脑缺血大鼠ig大黄素后,大黄素在血浆中的血药浓度,并研究大黄素在大鼠体内的药动学规律,为生物样品中蒽醌类化合物检测提供了一种可靠、简单的检测手段。

1 材料

1.1 药材与试剂

大黄素对照品(批号110756-200910,质量分数 $\geq 98\%$)、1,8-二羟基蒽醌(批号110829-9702,质量分数 $\geq 99\%$),中国食品药品检定研究院;大黄素,批号HL-20140415,质量分数 $\geq 95\%$,购自西安信瑞生物科技有限公司;质谱甲醇,美国TEDIA公司;乙酸铵,MS级,美国Fisher公司;超纯水,自制。

1.2 实验动物

SPF级健康雄性SD大鼠,体质量为 (280 ± 20) g,购自河北省实验动物中心,合格证号SCXK 2012-1-003,饲养于河南中医药大学SPF级实验动物中心,许可证号SYXK(豫)2010-0001。喂养环境:温度 $22 \sim 24$ °C;相对湿度 $(50 \pm 2)\%$ 。

1.3 仪器

Q-Exactive台式四极杆-轨道阱高分辨质谱仪、离心浓缩仪、Xcalibur质谱工作站, Thermo Fisher Scientific; KQ-100型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司; MS105DU型十万分之一分析天平、ME204E万分之一分析天平,上海梅特勒-托利多仪器有限公司;高速台式冷冻离心机、933型超低温冰箱,赛默飞世尔科技(中国)有限公司; KH-250E型超声波清洗器,昆山禾创超声仪器有限公司; XH-C涡旋混合器,金坛市国旺实验仪器厂; BE-3100超级混匀小精灵,海门市其林贝尔仪器制造有限公司; Milli-Q处理纯净水,美国Millipore公司。

1.4 药动学数据处理软件

采用DAS 3.0数据处理软件进行药动学参数计算和数据拟合;SPSS 19.0统计学软件对结果进行统计分析;Origin Pro8绘图软件绘制平均血药浓度-时间曲线。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

XBridgeTM C₁₈ (150 mm $\times$ 2.1 mm, 5 μ m)色谱柱,柱温30 °C;流动相为3 mmol/L乙酸铵-甲醇,

梯度洗脱, 梯度洗脱程序: 0~2 min, 30%甲醇; 2~10 min, 30%~60%甲醇; 10~13 min, 60%~30%甲醇; 体积流量为 0.3 mL/min; 进样体积为 5 μ L; 理论板数以大黄素峰面积计算为 16 824。

2.2 质谱条件

离子源为加热电喷雾离子化源 (HESI), 载气为氮气, 鞘气压力 3.5 MPa (35 bar), 辅助气压力 1.0 MPa (10 bar), 喷雾电压+3.50、-2.80 kV, 毛细管温度 350 $^{\circ}$ C, 辅助气加热温度 200 $^{\circ}$ C, 分辨率为 70 000, 扫描方式为全扫 (full scan) 模式, 负离子方式检测, 质谱记录负离子谱扫描范围 m/z 150~1 500。待测成分及内标用于定量分析的离子分别为大黄素 m/z 269.045 5 $[M-H]^{-}$ 、1,8-二羟基蒽醌 m/z 239.035 0 $[M-H]^{-}$ 。

2.3 溶液的配制

2.3.1 对照品溶液 精密称取大黄素对照品 7.76 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇超声使溶解, 并稀释至刻度, 摇匀。精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液, 4 $^{\circ}$ C 冷藏备用。精密量取上述对照品储备液适量, 用甲醇梯度稀释成一系列含大黄素质量浓度分别为 0.745 6、1.864、9.32、27.96、93.2、279.6、372.8、1 864、3 728 ng/mL 的对照品溶液。

2.3.2 内标溶液 精密称取 1,8-二羟基蒽醌对照品 11.45 mg, 置 250 mL 量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配成质量浓度为 0.916 μ g/mL 的内标储备液, 4 $^{\circ}$ C 冷藏备用。

2.4 大鼠脑缺血模型的制备

SD 大鼠, 用 10%水合氯醛 (3 mL/kg) ip 麻醉后, 仰卧手术台上, 用棉绳固定四肢和头, 消毒后, 颈正中切开。分离左侧颈总动脉 (CCA)、颈外动脉 (ECA) 和颈内动脉 (ICA)。结扎颈外动脉远心端和颈总动脉, 夹闭颈内动脉, 于颈总动脉和颈外动脉分叉处近心端剪 0.2 mm 小口, 松开动脉夹将线栓插入颈内动脉, 向上深入至分叉以上 18 mm 左右, 直至有阻力, 即阻断大脑中动脉入口处, 结扎颈内动脉近心端, 缝合伤口, 置于铺有干净垫料的鼠笼中。手术过程中维持环境温度 (23 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C。2 h 后轻轻抽出线栓, 直到有阻力, 即可恢复供血。

待动物麻醉清醒后, 采用 Longa 等^[20]标准进行神经功能评分。当大鼠出现行走时, 身体向偏瘫侧倾倒或不能自发行走, 意识丧失等体征, 即可视为

造模成功。

2.5 给药方案

取健康 SD 大鼠, 雄性, 体质量为 (280 $\pm$ 20) g。随机分为 2 组 (正常组和模型组), 每组 6 只。给药前 12 h 禁食, 自由饮水。按大黄素 34.65 mg/kg 的剂量 ig 给药 (用 0.5%的羧甲基纤维素钠水溶液混悬)。分别于给药前和给药后 0.083、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、4、6、8、12、24 h 尾静脉取血 0.5 mL 置肝素钠离心管中, 全血静置 30 min 后, 离心 (6 000 r/min) 20 min, 分取上层血浆。于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中冷藏保存, 备用。

2.6 血浆样品处理

精密取血浆 100 μ L 于 2 mL 离心管中, 加入“2.3.2”项下内标溶液 100 μ L, 加甲醇 400 μ L, 置于振荡器上涡旋振荡 15 min, 再 15 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 于离心浓缩仪中吹干, 残渣加初始流动相 100 μ L 使溶解, 作为供试品溶液, 取 5 μ L 进样分析, 内标法计算血浆中目标物质量浓度。

2.7 方法学考察

2.7.1 基质效应与提取回收率 按照对照品配制方法分别配制高、中、低 (776、77.6、7.76 μ g/mL) 3 种不同质量浓度的对照品溶液, 按照“2.1”和“2.2”项下方法进样, 测定大黄素及内标的峰面积 (A_1), 每个质量浓度平行测定 6 次; 取空白血浆样品, 按照“2.6”项方法处理后加入上述大黄素高、中、低不同质量浓度的对照品溶液, 分别测定大黄素及内标的峰面积 (A_2), 每个质量浓度平行测定 6 次; 按照样品处理方法直接测定高、中、低 3 个质量浓度的质控样品, 测定大黄素及内标的峰面积 (A_3), 每个质量浓度平行测定 6 次, 基质效应即为空白基质中加入相应质量浓度的质量控制溶液获得的峰面积 (A_2) 与未经提取的不含基质的质量控制样品获得的峰面积 (A_1) 之比。提取回收率即为提取后的峰面积 (A_3) 与空白基质加入相应质量浓度控制溶液获得的峰面积 (A_2) 之比。高、中、低 3 个质量浓度的平均提取回收率分别为 99.81%、93.76%、82.17%, RSD 值分别为 3.65%、2.78%、3.20%; 高、中、低 3 个质量浓度的平均基质效应分别为 103.9%、112.4%、102.8%, RSD 值分别为 4.78%、4.21%、3.98%。结果表明, 血浆基质基本不影响大黄素的定量检测且提取回收率良好。

2.7.2 专属性试验 在上述的色谱条件下, 大黄素与内标的色谱峰分离良好, 且在血浆样品中无杂质

峰干扰, 色谱图见图 1。

2.7.3 标准曲线和线性范围 取空白血浆 100 μL , 分别加入一系列不同质量浓度的大黄素对照品溶液 100 μL 和内标溶液 100 μL , 制得系列不同质量浓度的血浆样品。按“2.6”项下方法进行处理, 按“2.1”和“2.2”项下的条件进样测定, 同时计算大黄素与

内标的峰面积比值。以血浆中实际被测物的质量浓度为横坐标, 被测物与内标物的实际峰面积比值为纵坐标, $1/X$ 为权重, 进行线性回归计算, 求得回归方程为 $Y=0.2318X-0.01214$, $R^2=0.9941$; 表明大黄素血药浓度在 $149.12\sim7.456\times 10^5$ ng/mL 呈良好的线性关系。

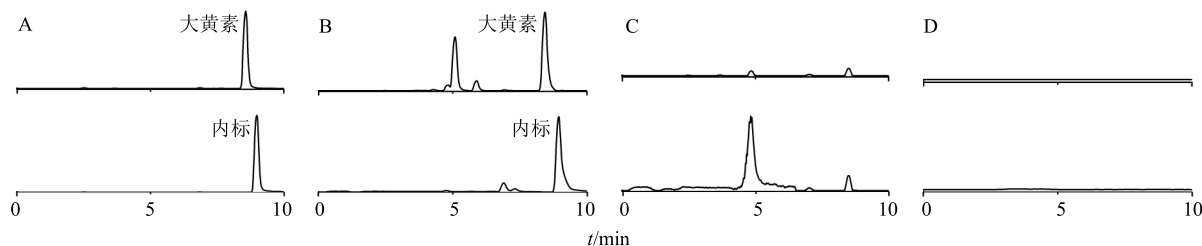


图 1 大黄素对照品及内标 (A)、给药血浆样品 (B)、空白血浆 (C) 和空白甲醇 (D) 的提取离子流色谱图

Fig. 1 XIC of emodin in rat plasma reference (A), plasma sample in rats after oral administration of emodin (B), blank plasma (C), and blank methanol (D)

取空白血浆 100 μL , 分别加入一系列质量浓度的大黄素对照品溶液和内标溶液, 按上述条件检测, 以信噪比 (S/N) 3:1 测得最低检测限为 19.60 ng/mL, 以 S/N 10:1 测得最低定量限为 149.1 ng/mL。

2.7.4 精密度与准确度 取大鼠空白血浆 3 份, 分别加入上述高、中、低 3 个不同质量浓度大黄素对照品溶液, 照“2.6”项下样品处理方法, 制成高、中、低 3 个质量浓度的质控样品 (quality control, QC), 每一质量浓度日内平行测定 5 次及连续测定 5 d, 随行标准法计算 QC 样品的质量浓度, 计算高、中、低 3 个质量浓度的日内精密度及日间精密度。准确度用相对误差 (RE) 表示, 精密度用相对标准偏差 (RSD) 表示。高、中、低 3 个质量浓度的日内准确度分别为 0.01%、-0.06%、-0.11%, 精密度分别为 0.01%、0.02%、0.07%; 高、中、低 3 个质量浓度的日间准确度分别为 0.00%、-0.08%、-0.12%, 精密度分别为 1.72%、4.96%、3.83%。

2.7.5 稳定性试验 取大鼠空白血浆 100 μL , 分别加入高、中、低 3 种质量浓度的大黄素对照品溶液, 每个质量浓度平行制备 6 份, 照样品处理方法处理后, 分别考察在自动进样器 (4 $^{\circ}\text{C}$) 内放置 12 h、-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存 30 d 以及样品经 3 次冷冻-解冻循环 (-20 $^{\circ}\text{C}$ 至室温) 后的短期、长期及冷冻-解冻稳定性。3 种条件下, 高、中、低 3 个质量浓度大黄素 RSD 分别低于 5.00%、3.49%、4.64%, 表明血浆样品在上述 3 种条件下基本稳定。

2.8 药动力学研究

大鼠 ig 给药后在不同的时间点采集血浆, 按“2.1”和“2.2”项下方法测定不同时间的血药浓度。药动力学个体数据分析采用非房室模型分析法, 采用 DAS 3.0 药动力学软件计算大黄素的药动力学参数, 并用 SPSS 19.0 统计学软件对药动力学参数进行统计分析。正常与脑缺血再灌注大鼠的平均血药浓度-时间曲线见图 2, 主要药动力学参数见表 1。结果表明, ig 大黄素后, 与正常大鼠的药动力学特征相比, 脑缺血大鼠血浆中的药时曲线下面积 (AUC)、半衰期 ($t_{1/2}$) 和平均滞留时间 (MRT) 显著增加 ($P<0.01$), 表观分布容积 (V_z/F) 明显增加 ($P<0.05$), 达峰浓度 ($C_{\max}$) 有增加趋势, 但无统计学差异, 清除率 (CL_z/F) 显著减小 ($P<0.01$)。

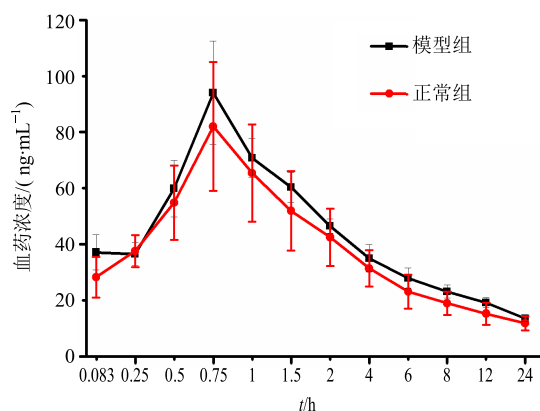


图 2 大黄素在正常大鼠与脑缺血模型大鼠中的药-时曲线
Fig. 2 Mean concentration-time profiles of emodin in normal rats and cerebral ischemia rats

表 1 大黄素在大鼠体内的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of emodin in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

参数	单位	大黄素			
		正常组		模型组	
$t_{1/2}$	h	10.31 ± 1.61		23.13 ± 3.56**	
$t_{\max}$	h	0.75 ± 0.22		0.75 ± 0.16	
$C_{\max}$	ng·mL ⁻¹	81.96 ± 20.72		91.65 ± 16.82	
$AUC_{0-\infty}$	ng·h·mL ⁻¹	605.63 ± 163.66		1 107.78 ± 191.11**	
$MRT_{0-\infty}$	h	13.58 ± 3.59		29.90 ± 4.71**	
V_z/F	L·kg ⁻¹	851.03 ± 97.30		1 051.87 ± 119.88*	
CL_z/F	L·h·kg ⁻¹	57.21 ± 14.98		31.99 ± 5.15**	

与正常组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs normal group

3 讨论

测定生物样品时,一般常用的样品前处理方法有:液液萃取法(LLE)、固相萃取法(SPE)和沉淀蛋白法(PPT)^[21]。其中,PPT因具有经济实用、操作简单的特点,成为最常被用到的生物样品前处理方法。在测定血浆样品时去除蛋白质的目的在于:①可以将和蛋白质结合的药物匀出,使药物浓度测定更加准确;②预防提取过程中蛋白质发泡,产生乳化作用,对提取造成影响;③保护仪器性能,如保护HPLC柱不被污染,提高仪器使用寿命。目前常用的除蛋白试剂为甲醇、乙腈、氯仿、醋酸乙酯等。本实验分别考察了甲醇、乙腈、甲醇-乙腈(1:1)与血浆用量4:1条件下,大黄素和内标1,8-二羟基蒽醌的基质效应和提取回收率,结果表明,使用纯甲醇除蛋白能力较其他2种溶剂杂质干扰少,且基质效应能控制在85%~115%,回收率在70%以上。符合生物样品测定要求。

本实验分别考察了以甲醇-水(a)、乙腈-水(b)、甲醇-0.1%甲酸水(c)、甲醇-3 mmol/L 乙酸铵(d)为流动相时,洗脱液对所测成分分离度,峰形及灵敏度的影响。对比a和b两系统,发现有机相是乙腈时,待测物峰形不佳,会造成积分不准确的情形,改用甲醇则可避免此现象;在c和d系统中,c系统的甲酸水对[M+H]⁺峰的检测有促进作用,但大黄素元多在[M-H]⁻峰的信号较强,故最终选用甲醇-3 mmol/L 乙酸铵为检测系统。

本实验选用大黄素的母核1,8-二羟基蒽醌为内标,其与大黄素成分具有相似的化学性质,经过实验考察,其基质效应和提取回收率均符合测定要求,

适合作为本实验测定用内标。

正常与脑缺血大鼠血浆中大黄素平均达峰时间($t_{\max}$)均为0.75 h,说明药物的吸收快且相对比较规则。与正常大鼠的药动学特征相比,大黄素在脑缺血再灌注大鼠血浆中的AUC、 $C_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 、MRT和 V_z/F 均增加,说明在脑缺血病理条件下大黄素的吸收增加,分布范围广; CL_z/F 显著减小,说明在病理条件下,大黄素的消除会减慢。实验结果表明,大黄素在脑缺血再灌注大鼠体内的生物利用度比正常大鼠的高,为大黄素治疗脑缺血疾病提供了理论依据。

该实验研究完成了大鼠血浆样品的预处理条件探索、利用HPLC-MS建立了一种血浆样品定量方法的方法学验证。所建立方法前处理过程简单、血浆用量少、灵敏度高、线性范围宽,质谱检测器与常用的高效液相检测器相比,避免了样品的复杂衍生过程,而且检测定量限较低,回收率和精密度较高,选择性较好。可满足大黄素的低浓度药物代谢分析要求。该研究建立了血浆样品中大黄素的质量控制体系,为利用HPLC-MS体系进行大黄素的药动学研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 卫生部新闻办公室. 第三次中国死因调查主要情况[J]. 中国肿瘤, 2008, 17(5): 344-345.
- [2] Tolmachev V. Imaging of HER-2 overexpression in tumors for guiding therapy [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(28): 2999-3019.
- [3] 刘松, 金梅香, 谭兴文. 西洋参茎叶皂苷保护大鼠脑缺血再灌注损伤的作用[J]. 中成药, 2016, 38(6): 418-421.
- [4] 薛进华, 王万辉, 黄静瑶, 等. 脑缺血再灌注损伤时细胞因子的改变及染料木素的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 197-200.
- [5] 李路超, 刘旺华. 中医药治疗脑缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(10): 193-196.
- [6] 赵颖, 辛秀峰, 徐安定, 等. 关键医疗质量指标监控对提高缺血性脑血管病临床医疗质量的作用[J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2013, 34(2): 186-190.
- [7] 聂金涛, 靳林静, 于文涛. 中药抗脑缺血的实验研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2015, 13(4): 509-511.
- [8] 中国药典[S]. 一部. 2015.
- [9] 黄伟锋. 大黄素的药理作用研究进展[J]. 柳州医学, 2013, 26(4): 241-244.

- [10] 杨念, 向龙超, 曹风军, 等. 大黄素对肿瘤转移作用及机制的研究进展 [J]. 肿瘤药学, 2016, 6(3): 173-177.
- [11] 李建生, 刘敬霞, 方建, 等. 大黄苷元抗大鼠脑缺血损伤及对炎性细胞因子的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(5): 275-278.
- [12] 李建生, 刘敬霞, 张伟宇, 等. 大黄素抗大鼠脑缺血损伤及对炎性因子反应的影响 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(24): 1939-1943.
- [13] 严志康, 肖端, 龚梅芳. 大黄对大鼠脑缺血-再灌注损伤 bc1-2、bax 表达的影响 [J]. 中国微循环, 2008, 12(5): 313-315.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 尤娇娇, 彭志红, 韩凤梅. HPLC-MS/MS 法同时测定平卧菊三七水提物中 9 种主要有效成分 [J]. 中草药, 2017, 48(2): 294-298.
- [17] 秦建平, 吴建雄, 郎悦, 等. 痛宁凝胶的 HPLC-MS 指纹图谱研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(4): 427-430.
- [18] 方昱, 万丽丽, 朱金辉, 等. HPLC-MS/MS 测定同济 2 号颗粒剂中黄芪甲苷、绿原酸、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 和三七皂苷 R₁ [J]. 药物评价研究, 2015, 38(4): 394-397.
- [19] 宋增锋, 彭娟, 马辰. LC-MS/MS 测定大鼠大黄素血药浓度及脑组织含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(6): 926-930.
- [20] Longa E Z, Wein S P, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [21] 黄金秋, 严雪梅, 冯芳, 等. 大黄中蒽醌类成分的药代动力学研究近况 [J]. 广州化工, 2014, 42(10): 18-19.