

白花蛇舌草中芦丁、槲皮苷、异槲皮苷在正常大鼠与荷瘤大鼠体内药动学研究

孟莹¹, 逯双², 陈明月¹, 王少平¹, 曹广尚^{3*}, 杨培民^{3*}

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

2. 北京和合医学诊断技术股份有限公司, 山东 济南 250000

3. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250011

摘要: 目的 以白花蛇舌草中黄酮苷类成分芦丁、槲皮苷、异槲皮苷为研究对象, 基于荷瘤大鼠模型, 研究黄酮苷类成分在病理状态下的药动学特征。方法 SD 大鼠 Walker-256 皮下肿瘤模型, 采用 HPLC-MS/MS 方法, 分析比较白花蛇舌草中黄酮苷在荷瘤状态及正常机体状态的药动学特征。结果 与正常大鼠黄酮苷药动学参数比较, 荷瘤大鼠体内黄酮苷类成分芦丁、槲皮苷、异槲皮苷的最大浓度 ($C_{\max}$)、曲线下面积 ($AUC_{0-\infty}$) 均明显降低, 半衰期 ($t_{1/2\alpha}$) 延长, 且 3 种成分在 24 h 后仍能检测到, 代谢时间延长, 揭示病理状态对黄酮苷药动学特征造成影响。结论 HPLC-MS/MS 法操作简便、分析速度快、灵敏, 适用于黄酮苷在大鼠体内的药动学研究, 白花蛇舌草黄酮苷类成分在正常大鼠和荷瘤大鼠体内药动学特征有所差异。

关键词: 白花蛇舌草; 黄酮苷; 荷瘤大鼠; 药动学; 芦丁; 槲皮苷; 异槲皮苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)06-1345-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.06.017

Pharmacokinetics of rutin, quercitrin, and isoquercitrin in *Hedyotis diffusa* in normal and tumor-bearing ratsMENG Ying¹, LU Shuang², CHEN Ming-yue¹, WANG Shao-ping¹, CAO Guang-shang³, YANG Pei-min³

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China

2. Beijing Harmony Health Medical Diagnostics Co., Ltd., Ji'nan 250000, China

3. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250011, China

Abstract: Objective Based on the tumor-bearing rat model, using rutin, quercitrin, and isoquercitrin from *Hedyotis diffusa* as the research object, the pharmacokinetics of those three flavonoid glycosides in the pathological state was studied. **Methods** Establishing a method for the comparison of the pharmacokinetics of flavonoid extracts in normal rats and tumor-bearing rats, which was analyzed by HPLC-MS/MS in subcutaneous tumor models of SD rat made with tumour cell of Walker-256. **Results** Compared with the pharmacokinetics parameters of flavonoid glycosides in normal rats, the $C_{\max}$ and $AUC_{0-\infty}$ of rutin, quercetin, and isoquercitrin in the tumor-bearing rats were significantly decreased, $t_{1/2\alpha}$ was prolonged, and the metabolic time of three components was prolonged to 24 h, which revealed the effect of pathological condition on the pharmacokinetic characteristics of flavonoid glycosides. **Conclusion** The method established in this study is simple, fast, sensitive, and suitable for the pharmacokinetic study of flavonoid glycosides in rats *in vivo*. The pharmacokinetic characteristics of flavonoids in normal and tumor-bearing rats are different.

Key words: *Hedyotis diffusa* Willd.; flavonoid glycosides; tumor-bearing rats; pharmacokinetics; rutin; quercitrin; isoquercitrin

肿瘤学研究是医学科学研究中最为活跃的领域之一, 2006 年 WHO 将肿瘤论述为可控性疾病, 使无法治愈的肿瘤患者保持良好的生活质量而“带瘤生存”, 已成为中西医肿瘤界的学术共识^[1]。临床常用抗肿瘤中药白花蛇舌草在配合放、化疗增效减毒,

术后防治肿瘤复发转移, 减缓疼痛, 改善患者免疫能力, 提高带瘤生存质量等方面具有明显优势^[2-3]。

白花蛇舌草为茜草科植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd. 的干燥全草, 其味苦、甘, 性寒, 归心、肝、脾经, 具有清热解毒、利尿消肿、抗癌止痛的

收稿日期: 2017-09-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773950, 81274052); 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2015HL116, ZR2011HL043)

作者简介: 孟莹 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新药开发与中药制剂研究。Tel: 15964011109 E-mail: mengying3374@sina.com

*通信作者 杨培民, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新药开发与中药制剂研究。E-mail: jnypm7777@163.com

曹广尚 Tel: (0531)68617919 E-mail: cgs198041@163.com

功效^[4-5]。临床上白花蛇舌草主要用于抗肿瘤、抗菌消炎,其多糖和黄酮类物质均为发挥药效的活性成分^[6-8]。白花蛇舌草中黄酮苷类成分是其发挥抗肿瘤疗效的物质基础,黄酮苷类成分对肿瘤细胞具有较强的直接抑杀功能^[9],其中芦丁、异槲皮苷、槲皮苷是白花蛇舌草黄酮苷的主要活性成分^[10]。黄酮苷口服生物利用率低,其相对分子质量大,极性大,在胃肠道转运时间内难以溶解;分子中多元羟基、糖基等结构的存在使其难以通过原形的方式在小肠吸收^[11]。本研究基于荷瘤大鼠模型,研究白花蛇舌草黄酮苷在病理状态下的代谢转化,揭示中药苷类成分肠内代谢转化机制。

1 材料

1.1 实验仪器

Thermo U3000 HPLC (美国, Thermo Fisher, 配有脱气机、双三元梯度泵、自动进样器,柱温箱); Sciex TQ 4500 MS (美国, SCIEX 公司,三重四极杆质谱仪,配有 ESI 源, Chemstation B02.02 化学工作站); KQ-500E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Vortex Genius3 涡旋混匀器 (广州仪科实验技术有限公司); ST40R 低温离心机、Thermo 移液器 (美国 Thermo 公司); AE240 十万分之一电子天平 (瑞士梅特勒公司); BCD-197KA 低温冰箱 (中国新飞电器有限公司); BIOBASE 二级生物安全柜 (济南鑫贝西生物技术有限公司); MEMMERT 细胞培养箱 (德国美而特有限公司); DW-HL540 低温冰箱 (中国美菱股份有限公司); DK-8D 三孔电热恒温槽 (上海比朗仪器制造有限公司); Axiovert 40 C 倒置显微镜 (德国蔡司股份公司); Eppendorf AG 超低温高速离心机 (德国艾本德股份公司)。

1.2 药品与试剂

对照品芦丁 (批号 MUST-16122011, 质量分数 99.95%)、槲皮苷 (批号 MUST-16051605, 质量分数 99.81%)、异槲皮苷 (批号 MUST-16051010, 质量分数 99.74%)、葛根素 (内标, 批号 MUST-16011207, 质量分数 99.71%), 均购于成都曼思特生物科技有限公司; 肝素钠注射液 (125 000 U, 上海第一生化药业有限公司); RPMI 1640 培养基 (美国 Hyclone 公司); FBS 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司); PBS 缓冲液 (美国 Hyclone 公司); 青霉素-链霉素溶液 (100 X, 上海博升生物科技有限公司); 甲醇、乙腈 (美国 Fisher 公司); 甲酸 (国药集团化学试剂有限公司); 水为超纯水。

1.3 实验瘤株和动物

1.3.1 细胞株来源 Walker-256 肿瘤细胞, 来源于中国典型培养物保藏中心。

1.3.2 动物来源 SD 大鼠, 雄性, SPF 级, 体质量 (70±20) g; Wistar 大鼠, 雄性, SPF 级, 体质量 (70±20) g, 济南朋悦实验动物繁育有限公司, 动物许可证号 SCXK (鲁) 20140007。

1.4 药材

白花蛇舌草由山东中医药大学附属医院药学部提供, 经山东中医药大学李峰教授鉴定为茜草科植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd. 的干燥全草。

2 方法与结果

2.1 白花蛇舌草黄酮提取物制备

称取白花蛇舌草粉末 500 g, 加入 70%乙醇 6 000 mL, 浸泡 1 h, 回流提取 2 次, 首次 2 h, 第 2 次 1.5 h, 滤过, 合并滤液, 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 减压回收乙醇并浓缩至 0.2 g/mL, 并调节 pH 值为 5.0 后进行上样, 上样量为 0.4 g/mL (生药量/树脂量), 上样完毕后静置 1 h, 然后采用 8 BV 纯化水以 3 BV/h 的体积流量进行洗脱, 除去水溶性杂质, 再用 5 BV 的 70%乙醇洗脱, 体积流量为 2 BV/h, 收集乙醇洗脱液, 回收乙醇, 浓缩, 减压干燥, 即得白花蛇舌草总黄酮提取物 (总黄酮质量分数为 60.5%)。

2.2 大鼠 Walker-256 皮下肿瘤模型制备^[12-14]

从液氮中取出冻存的 Walker-256 肿瘤细胞株, 培养细胞至细胞悬液密度为 1×10^7 , 于 Wistar 大鼠左下腹皮肤消毒, ip 10%水合氯醛麻醉, 用 1 mL BD 注射器抽取细胞悬液 0.2 mL, 于 Wistar 大鼠消毒后的右下腹腔部 ip 肿瘤细胞悬液, 正常饲养 Wistar 大鼠, 待 Wistar 大鼠出现腹水瘤后的 3~5 d 内抽出草黄色液体, 放置无菌离心管中, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 加入 PBS 稀释备用。

取 40 只 SD 大鼠, 于大鼠左下腹皮肤消毒, ip 10%水合氯醛麻醉。将备用的腹水瘤细胞调整细胞悬液密度至 1×10^7 , 用 1 mL BD 注射器抽取细胞悬液 0.2~0.4 mL, 于 SD 大鼠消毒后的右下腹股沟处, 缓慢注入细胞悬液, 正常饲养 SD 大鼠, 接种后 2 周, 肿瘤直径约 1 cm 时用于药动学实验。

2.3 液质条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Accucore C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 2.6 μm); 流动相为 0.1%甲酸水 (A)-甲醇 (B), 梯度洗脱: 0~1 min, 10% B; 1~6 min, 10%~90% B; 6~10 min, 90%~10% B; 检测波长 254 nm,

体积流量为 0.3 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 2 μ L。

2.3.2 质谱条件 ESI 电喷雾负离子检测; 离子源温度 550 °C; 离子喷雾电压 4 500 V; 气帘气压为 35 kPa; 雾化气气压为 55 kPa; 辅助气气压为 55 kPa; 气帘气、雾化气和辅助气均是氮气; 扫描模式为多反应离子检测 (MRM); 监测离子对: 芦丁 m/z 609.0 $\rightarrow$ 300.1 (去簇电压 DP: -140 V; 碰撞能量: -50 eV); 槲皮苷 m/z 447.0 $\rightarrow$ 271.0 (去簇电压: -100 V; 碰撞能量: -60 eV); 异槲皮苷 m/z 463.2 $\rightarrow$ 255.1 (去簇电压: -110 V; 碰撞能量: -55 eV); 葛根素 m/z 415.0 $\rightarrow$ 295.1 (去簇电压: -120 V; 碰撞能量: -45 eV)。

2.4 溶液的配制

2.4.1 分析物储备液及工作溶液配制 精密称取一定量的芦丁、槲皮苷、异槲皮苷对照品至 25 mL 量瓶中, 精密加入一定体积的甲醇溶液, 分别配制成质量浓度为 0.30 mg/mL 的储备液, 每次平行配制 2 份, 分别为储备液 A 和储备液 B。储备液 A 用于标准曲线样品的配制; 储备液 B 用于精密度、准确性、稳定性、回收率和基质效应等样品的配制。该储备液保存在 4 °C 冰箱中。

2.4.2 内标储备液及工作溶液配制 精密称取一定量的内标化合物葛根素至 5 mL 量瓶中, 精密加入一定体积的甲醇溶液, 配制成质量浓度为 0.40 mg/mL 的内标储备液。取葛根素内标储备液 1 mL 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 配成含葛根素质量浓度为 4 μ g/mL 的内标溶液, 待用。

2.5 血浆样品的处理

精密吸取大鼠血浆样品 100 μ L 至 1.5 mL EP 管中, 加入内标葛根素溶液 (4 μ g/mL) 20 μ L, 加乙

腈 280 μ L 沉淀蛋白, 涡旋 2 min, 4 °C、11 000 r/min 离心 10 min, 取 200 μ L 上清液作为样品进行分析。

2.6 血浆样品分析方法的方法学考察

2.6.1 专属性考察 取 6 只不同大鼠混合空白血浆 100 μ L, 按“2.5”项下的方法操作, 内标用甲醇代替, 得空白血浆样品, 评价血浆中成分是否存在干扰; 取空白血浆加混合对照品溶液和内标溶液, 按“2.5”项下的方法操作, 得混合对照品血浆样品; 取大鼠 ig 给药 30 min 后的血浆样品, 同法操作, 得实验血浆样品。分别将血浆样品按“2.3”项下的条件进样检测, 质谱分析及方法专属性各成分用于定量分析的监测离子及血浆样品色谱图见图 1 和 2。在选定的色谱及质谱条件下, 被测物不受血浆中内源性物质干扰, 且与内标成分可实现完全分离, 色谱峰保留时间与对照品保留时间一致。

2.6.2 线性范围及定量限 精密吸取一定量的芦丁、槲皮苷、异槲皮苷混合对照品储备液 A, 用甲醇稀释, 配成质量浓度为 30、120、600、3 000、6 000、16 000 ng/mL 的混合对照品溶液。精密吸取对照品溶液 20.0 μ L, 按“2.4.1”项下的方法操作, 制得质量浓度为 5、20、100、500、1 000、2 500 ng/mL 的标准曲线样品。

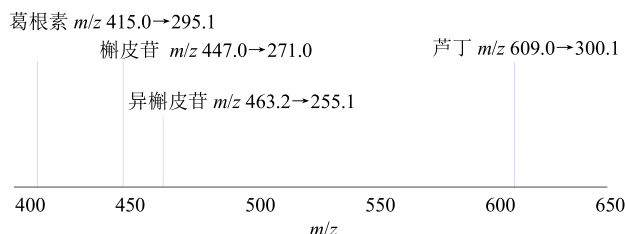


图 1 待测物及内标质谱图

Fig. 1 Mass chromatogram of test substances and internal standards

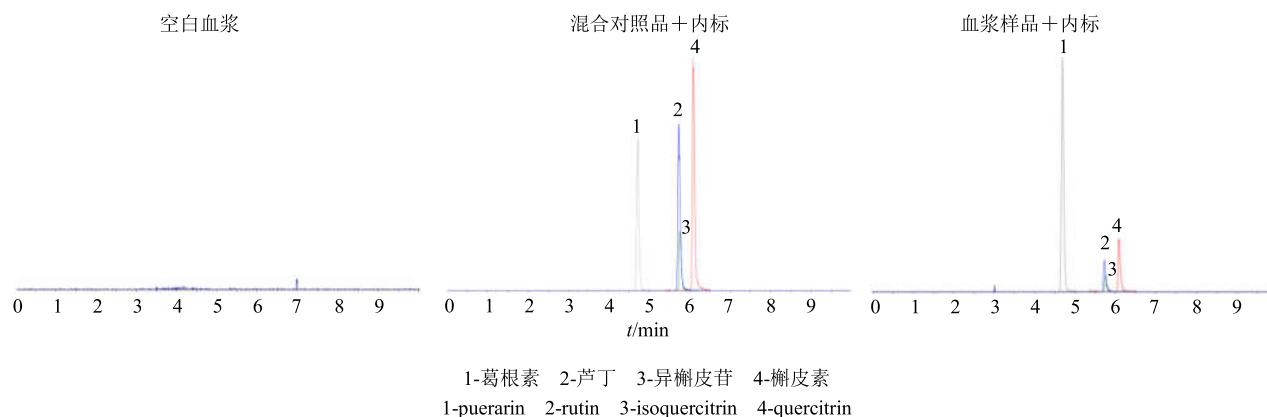


图 2 血浆样品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of plasma samples

分别以样品和内标的峰面积比值为纵坐标 (Y), 质量浓度 (X) 为横坐标进行线性回归, 权重系数为 $1/X$, 得血浆中芦丁、槲皮苷、异槲皮苷的标准曲线。根据 $S/N=10$ 计算各成分的定量限。血浆中各成分的标准曲线、相关系数、线性范围及定量限见表 1。

2.6.3 精密度与准确度试验 精密吸取芦丁、槲皮苷、异槲皮苷储备液 B, 用甲醇稀释, 配制成质量浓度为 30、1 200、15 000 ng/mL 的对照品溶液。按

照“2.5”项下操作, 制得质量浓度为 5、200、2 500 ng/mL 的样品, 得到低、中、高质量浓度的芦丁、槲皮苷、异槲皮苷质量控制 (QC) 样品。连续测定 3 d, 每个质量浓度进行 5 样本分析, 外标法计算 QC 的质量浓度。根据 QC 样品测定结果, 计算精密度与准确度。测得日内精密度 RSD 小于 10%, 日间精密度 RSD 小于 14%, 准确度在 85.4%~110.7%, 符合生物样品分析要求。

表 1 芦丁、槲皮苷、异槲皮苷的标准曲线和定量限

Table 1 Calibration curves and quantitation limit of rutin, quercitrin, and isoquercitrin

成分	标准曲线	r	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	定量限/(ng·mL ⁻¹)
芦丁	$Y=0.016 X+0.031$	0.994 3	5~2 500	6.26
槲皮苷	$Y=0.021 X+0.039$	0.997 1	5~2 500	7.82
异槲皮苷	$Y=0.023 X+0.093$	0.995 7	5~2 500	6.76

2.6.4 提取回收率和基质效应 精密吸取芦丁、槲皮苷、异槲皮苷储备液 B, 用甲醇稀释, 配制成质量浓度为 30、1 200、15 000 ng/mL 的对照品溶液。按照“2.5”项下操作, 制得质量浓度为 5、200、2 500 ng/mL 的样品, 得到低、中、高质量浓度的芦丁、槲皮苷、异槲皮苷 QC 样品。每个样本平行 5 份, 以对照品与内标峰面积的比值为 A1; 另取空白血浆 100 μ L, 按“2.5”项下操作, 取上清液加入混合对照品的储备溶液 B, 质量浓度与同上, 每个样本平行 5 份, 进行 LC-MS 分析, 对照品和内标峰面积的比值为 A2; 另取混合对照品储备液 B 稀释至质量浓度为 5、200、2 500 ng/mL, 连续进样 5 次, 对照品和内标峰面积的比值为 A3。A2 与 A3 的比值为基质效应, A1 与 A2 的比值为提取回收率。结果低、中、高质量浓度下 3 种黄酮苷以及内标的提取回收率在 84%~98%, 基质效应在 87%~99%, 表明内源性物质对 3 种黄酮苷和内标的离子化不具有干扰作用。

2.6.5 稳定性试验 配制含对照品质量浓度为 20、1 000 ng/mL 的血浆样品, 分别考察短期稳定性 (4 $^{\circ}$ C 放置 24 h)、长期稳定性 (-80 $^{\circ}$ C 放置 21 d) 及冻融稳定性 (-80 $^{\circ}$ C 冷冻, 反复冻融处理 3 次), 每个样品质量浓度平行 3 次, 测定血浆分析物质量浓度。血浆中的 3 种黄酮苷在不同处理条件的稳定性见表 2, 表明 3 种黄酮苷的稳定性良好。

2.7 白花蛇舌草黄酮苷在健康大鼠与荷瘤大鼠体内药动学研究

取 6 只 SD 大鼠, 体质量 (200 $\pm$ 20) g; 6 只

表 2 芦丁、槲皮苷、异槲皮苷稳定性试验结果

Table 2 Stability test results of rutin, quercitrin, and isoquercitrin

条件	成分	ρ /(ng·mL ⁻¹)	准确度/%	RSD/%
短期稳定性	芦丁	20	92.7	3.8
		1 000	97.3	7.3
	槲皮苷	20	88.3	5.9
		1 000	101.9	3.2
	异槲皮苷	20	86.3	4.8
		1 000	92.1	4.2
长期稳定性	芦丁	20	89.4	5.3
		1 000	105.7	6.7
	槲皮苷	20	103.0	4.3
		1 000	98.7	4.9
	异槲皮苷	20	86.2	6.3
		1 000	93.7	3.7
冻融稳定性	芦丁	20	91.9	4.5
		1 000	90.3	4.9
	槲皮苷	20	100.4	6.3
		1 000	94.6	5.1
	异槲皮苷	20	89.4	2.5
		1 000	92.5	6.1

皮下肿瘤荷瘤大鼠, 于实验前 12 h 禁食不禁水。分别 ig 给予 40 mg/kg 白花蛇舌草黄酮提取物, 给药前取空白血浆, 并分别于给药后 0.083、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、4、6、8、12、24 h 眼内眦取血, 每次约 0.5 mL, 置于预先肝素化的 1.5 mL EP 离心管中, 经 4 500 r/min 高速离心 10 min 后分离血浆,

分取 100 μL 置于 1.5 mL EP 离心管中, 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻储藏。血浆样品按照“2.5”项下操作, 并建立标准曲线, 所得数据采用 DAS2.0 软件, 以非房室模型计算拟合药动学参数, 比较健康大鼠与荷瘤大鼠各项药动学参数差异。

应用建立的 LC-MS 方法测定各时间点血药浓度结果显示各成分在大鼠血浆中均能检测到, 结果表明正常大鼠 ig 白花蛇舌草总黄酮提取物后, 芦丁、槲皮苷、异槲皮苷在体内血药浓度-时间曲线趋势一致, 且质量浓度较低; 异槲皮苷最快于 0.72 h 处出

现达峰浓度, 其次是槲皮苷、芦丁, 表明黄酮苷类成分在体内吸收较快。通过比较白花蛇舌草黄酮提取物中 3 种成分所占比例及在体吸收浓度, 得知 SD 大鼠机体对槲皮苷的吸收能力较差。与正常大鼠黄酮苷药动学参数比较, 荷瘤大鼠 ig 相同剂量白花蛇舌草总黄酮提取物后, 其药物最大浓度 (C_{max})、曲线下面积 ($\text{AUC}_{0\sim\infty}$) 均明显降低, 半衰期 ($t_{1/2z}$) 延长, 且 3 种成分在 24 h 后仍能检测到, 代谢时间延长, 揭示病理状态下对黄酮苷药动学特征造成的影响。3 种成分的药时曲线见图 3, 药动学参数见表 3。

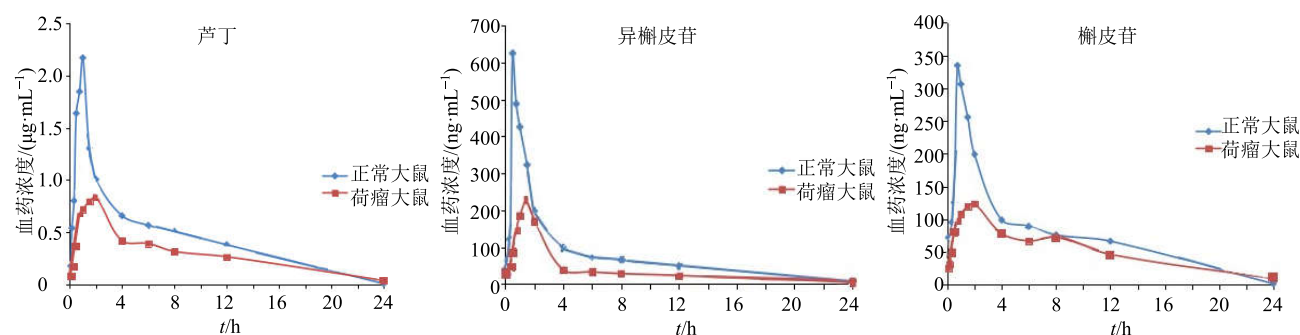


图 3 正常大鼠与荷瘤大鼠 ig 白花蛇舌草总黄酮提取物后体内芦丁、异槲皮苷和槲皮苷的药时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 3 Mean concentration-time curve of rutin, isoquercitrin, and quercitrin in normal and tumor-bearing rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表 3 正常大鼠与荷瘤大鼠 ig 白花蛇舌草总黄酮提取物后体内芦丁、异槲皮苷和槲皮苷主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Pharmacokinetics parameters of rutin, isoquercitrin, and quercitrin in normal and tumor-bearing rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	单位	正常大鼠			荷瘤大鼠		
		芦丁	槲皮苷	异槲皮苷	芦丁	槲皮苷	异槲皮苷
C_{max}	$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$2\,173.08 \pm 203.28$	334.66 ± 191.42	625.63 ± 143.21	836.10 ± 327.41	123.65 ± 145.93	227.93 ± 127.02
t_{max}	h	1.19 ± 0.23	0.86 ± 0.18	0.72 ± 0.13	2.83 ± 1.32	2.49 ± 0.88	1.68 ± 0.73
$t_{1/2z}$	h	6.29 ± 1.43	3.09 ± 0.33	3.57 ± 0.43	8.25 ± 2.14	5.40 ± 1.72	5.46 ± 0.75
$\text{AUC}_{0\sim t}$	$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	$12\,787.12 \pm 2\,099.93$	$1\,321.23 \pm 421.58$	$1\,762.34 \pm 328.59$	$6\,906.36 \pm 936.75$	$1\,247.47 \pm 640.91$	899.72 ± 428.54
$\text{AUC}_{0\sim\infty}$	$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	$13\,891.48 \pm 2\,181.07$	$1\,523.52 \pm 305.21$	$1\,958.42 \pm 314.58$	$7\,187.71 \pm 972.13$	539.18 ± 364.78	927.17 ± 320.75

3 讨论

3.1 分析方法的优化

液质联用时流动相通常加入挥发性酸 (甲酸) 以得到较稳定的离子峰及较好的峰形, 因此在条件优化时分别筛选乙腈-0.1% 甲酸水溶液, 甲醇-0.1% 甲酸水溶液, 结果表明乙腈-0.1% 甲酸水溶液色谱峰分离度较差; 而甲醇-0.1% 甲酸水溶液则有较好的分离度和离子响应值。因此选择甲醇-0.1% 甲酸水溶液作为流动相, 梯度洗脱。

Accucore HPLC 色谱柱采用表面多孔增强核技术, 具有分析通量高、分析时间少、溶剂成本低等优点, 本实验综合考虑到分离度、分析时间等因

素, 选择 Accucore C_{18} ($100\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}$, $2.6\text{ }\mu\text{m}$) 柱为分析柱。

比较 30、35、40 $^{\circ}\text{C}$ 柱温时化合物分离情况, 由于提高柱温可使化合物出峰时间提前, 同时被测物质在 40 $^{\circ}\text{C}$ 有较好的分离度, 因此柱温选择 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.2 内标选择

内标物选择要求严格, 其应与被分析物具有一致的物理化学性质、色谱行为、响应特征。本实验筛选过程中, 对木犀草素、非瑟酮、葛根素进行了考察, 研究发现木犀草素峰形不好, 非瑟酮在血浆样品中稳定性不够, 而葛根素则与被分析物有较好

的分离度及响应值, 因此确定葛根素为内标物。

3.3 大鼠品种选择

由于后期荷瘤大鼠造模文献多采用 Wistar 大鼠, 因此前期预试验对 Wistar 大鼠及 SD 大鼠分别进行了药动学试验。结果显示, Wistar 大鼠药动学数据有干扰, 多次改变色谱条件后分析物芦丁、槲皮苷、异槲皮苷仍难以测定其明确数值, 且不同时间采血点中药物的含量大致无差别, 原因可能为白花蛇舌草黄酮苷与 Wistar 大鼠血浆某些物质作用有关, 换用 SD 大鼠作为实验动物后, 3 种黄酮苷成分可清晰测定各自数值, 实验结果具有良好趋势, 与相关文献描述一致, 因此最终确定 SD 大鼠为最终实验动物, 而 Wistar 大鼠用于腹水瘤模型的制作。

3.4 白花蛇舌草黄酮苷在正常大鼠与荷瘤大鼠体内药动学特征

3 种黄酮苷成分在荷瘤大鼠体内浓度-时间曲线趋势与正常大鼠大致保持一致, 但 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 均明显降低, $t_{1/2z}$ 延长, 且 3 种成分在 24 h 后仍能检测到, 代谢时间延长, 推测其原因可能是在肿瘤状态下肠道菌群处于失衡状态, 造成菌群结构组成发生变化, 或影响体内酶的数量及活力, 从而对黄酮苷类物质代谢吸收造成影响。或是因为肿瘤状态影响大鼠进食、胃肠蠕动、排泄等功能, 进而使黄酮苷成分在体内滞留时间长, 清除减慢, 为中药与机体作用机制研究提供新思路。同时研究发现荷瘤大鼠个体间药动学数据存在差异, 且药时曲线出现峰谷波动, 其原因可能是大鼠在肿瘤病理状态下的个体差异造成的。

本实验比较黄酮苷成分在不同机体状态 (正常状态、病理状态) 下的药动学特征, 但只以血浆中原型物作为检测指标, 揭示进一步深入研究的方向及重心, 即探究代谢产物的途径及差异, 以深入探究黄酮苷在体内的代谢过程及影响因素。

参考文献

- [1] 周岱翰. 中药抗肿瘤研究的评析与前景 [J]. 新中医, 2008, 40(11): 1-3.
- [2] Cho W C S. *Evidence-Based Anticancer Materia Medica* [M]. Berlin: Springer Netherlands, 2011.
- [3] Niu Y, Meng Q X. Chemical and preclinical studies on *Hedyotis diffusa* with anticancer potential [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2013, 15(5): 550-565.
- [4] 车景超, 辛宁, 丰杰. 白花蛇舌草药理研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(20): 6162.
- [5] Lin J, Wei L, Xu W, et al. Effect of *Hedyotis diffusa* Willd extract on tumor angiogenesis [J]. *Mol Med Rep*, 2011, 4(6): 1283-1288.
- [6] Chen R, He J Y, Tong X L, et al. The *Hedyotis diffusa* Willd. (Rubiaceae): A review on phytochemistry, pharmacology, quality control and pharmacokinetics [J]. *Molecules*, 2016, 21(6): 710-749.
- [7] Si J, Chen D, Pan R, et al. Chemical constituents of *Hedyotis diffusa* [J]. *Nat Prod Res Devel*, 2006, 18(6): 942-944.
- [8] Lin J, Chen Y, Wei L, et al. *Hedyotis diffusa* Willd extract induces apoptosis via activation of the mitochondrion-dependent pathway in human colon carcinoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(5): 1331-1338.
- [9] 逯双, 杨培民, 曹广尚. 白花蛇舌草活性成分多糖与黄酮研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(3): 122-125.
- [10] 李芳, 杨培民, 曹广尚. 白花蛇舌草黄酮类成分大鼠在体肠吸收研究 [J]. 中草药, 2015, 46(2): 240-244.
- [11] 周乐, 赵晓莉, 狄留庆, 等. 黄酮类化合物口服吸收与代谢特征及其规律分析 [J]. 2013, 44(16): 2313-2320.
- [12] 高佳琦. ω -3 多不饱和脂肪酸对荷瘤大鼠的作用 [D]. 上海: 复旦大学, 2008.
- [13] 林晖明. 消痰散结方对荷瘤大鼠蛋白质代谢影响的实验研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2007.
- [14] 沈国庆. 基于动物肿瘤模型的 LC-MS/MS 代谢组学及药物代谢组学方法研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2011.