

大鼠 ig 牡丹皮提取物后丹皮酚及其代谢产物的药动学研究

胡欣彤^{1,2}, 丁丽琴², 李巍^{1,3}, 邱峰^{1,2*}

1. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193

2. 天津中医药大学中医药研究院, 天津 300193

3. 日本东邦大学 药学部, 千叶 274-8510

摘要:目的 考察 ig 给予大鼠牡丹皮提取物后, 丹皮酚及 4 种主要代谢产物 M1~M4 在大鼠体内的药动学特征。方法 SD 雄性大鼠 ig 给予不同剂量 (0.5、1.0、2.0 g/kg) 牡丹皮提取物, 于各时间点从大鼠眼底静脉丛取血, 收集血浆样品; ig 给予 1.0 g/kg 的牡丹皮提取物, 按相应时间段收集大鼠尿液、胆汁和粪便样品。生物样品用乙腈 (含 0.1% 甲酸) 沉淀蛋白的方法处理, 用建立的超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS) 分析方法检测生物样品中丹皮酚及其 4 种代谢产物质量浓度。结果 建立的生物样品分析方法符合分析要求。ig 给予大鼠不同剂量 (0.5、1.0、2.0 g/kg) 牡丹皮提取物后, 丹皮酚的 $t_{\max}$ 分别为 (0.15±0.08)、(0.33±0.19)、(0.31±0.13) h; $t_{1/2}$ 为 (1.16±0.37)、(1.19±0.45)、(1.24±0.35) h; $C_{\max}$ 和 AUC_{0-t} 随给药剂量的增加而增大, 具有剂量依赖性。M1~M4 在给药后 1 h 内也相继达到峰浓度。ig 给予 1.0 g/kg 的牡丹皮提取物后, 丹皮酚的代谢产物主要排泄方式为尿液>胆汁>粪便。结论 大鼠 ig 给予牡丹皮提取物后, 丹皮酚具有快速吸收、代谢及消除的特点, 丹皮酚主要通过尿液途径以代谢产物形式排泄。

关键词: 牡丹皮提取物; 丹皮酚; 代谢产物; 药动学; UPLC-MS/MS

中图分类号: R285.61

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)24-6017-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.24.015

Pharmacokinetics of paeonol and its metabolites after oral administration of *Moutan Cortex* in rats

HU Xin-tong^{1,2}, DING Li-qin², LI Wei^{1,3}, QIU Feng^{1,2}

1. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

3. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University, Chiba 274-8510, Japan.

Abstract: **Objective** To investigate the pharmacokinetics of paeonol and its metabolites M1—M4 in rats after intragastric administration of *Moutan Cortex*. **Methods** SD rats were orally administered different doses (0.5, 1.0, 2.0 g/kg) of *Moutan Cortex*, and blood was taken from the fundus venous plexus at various time points to collect plasma samples. After given 1.0 g/kg *Moutan Cortex* extract, urine, bile and feces samples were collected for the corresponding time period. The biological samples were treated with acetonitrile (containing 0.1% formic acid) to precipitate protein, and the established UPLC-MS/MS analysis method was used to detect the content of paeonol and its four metabolites in biological samples. **Results** The established biological sample analysis method satisfied the analytical requirements. After administered to rats with doses (0.5, 1.0, 2.0 g/kg) of *Moutan Cortex* extract, the $t_{\max}$ of paeonol was (0.15 ± 0.08) h, (0.33 ± 0.19) h, (0.31 ± 0.13) h; and $t_{1/2}$ was (1.16 ± 0.37) h, (1.19 ± 0.45) h, (1.24 ± 0.35) h. $C_{\max}$ and AUC_{0-t} were increased with the increase of dosage of *Moutan Cortex* extract, which showed dose-dependent manner. M1—M4 also reached $C_{\max}$ after 1 h of administration. The main way of excretion of metabolites was confirmed by urine > bile > feces. **Conclusion** After ig administration of *Moutan Cortex*, paeonol has the characteristics of rapid absorption, metabolism and elimination and mainly excreted in the form of metabolites through urine.

Key words: *Moutan Cortex*; paeonol; metabolites; pharmacokinetics; UPLC-MS/MS

收稿日期: 2019-05-23

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (81430095); 天津市应用基础及前沿技术研究计划 (16JCYBJC27900)

作者简介: 胡欣彤 (1993—), 女, 在读硕士, 研究方向为药物代谢与药动学。E-mail: huxintong0715@163.com

*通信作者 邱峰 (1967—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药及天然药物药效物质。E-mail: fengqiu20070118@163.com

牡丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮, 始载于《神农本草经》, 列为中品, 其味苦、辛; 性微寒; 归心、肝、肾经, 具有清热凉血、活血化瘀的功效^[1]。现代药理学研究表明, 牡丹皮具有抗氧化^[2]、抗炎^[3]、抗肿瘤^[4-6]、心血管保护^[7]、神经保护^[8]、保肝^[9]、调节糖脂代谢^[10]等多种药理作用。牡丹皮还被应用于多种处方中, 如六味地黄丸、茯苓桂枝丸、温经汤、大黄牡丹汤等。丹皮酚为牡丹皮中重要的活性成分, 且也具有多种生物学效应^[11-13], 《中国药典》2015 年版规定丹皮酚作为牡丹皮的指标性成分, 其含量不少于 1.2%。尽管牡丹皮及其主要成分丹皮酚已被证实具有显著的药理作用和临床效果, 但丹皮酚在体内吸收快和消除快的特点并不能很好地解释其药效。前期课题组研究发现丹皮酚在大鼠体内共有 25 个代谢物成分^[14], 说明它在体内发生了广泛代谢, 由此推测, 丹皮酚和代谢产物共同起效。因此, 为进一步了解牡丹皮提取物给药后丹皮酚在大鼠体内的药动学特征, 本研究采用超高效液相色谱-串联质谱技术 (UPLC-MS/MS), 对 SD 大鼠单次 ig 牡丹皮提取物后, 检测大鼠血浆、尿液、胆汁、粪便中丹皮酚以及 4 种主要代谢产物的质量浓度, 分析各化合物的药动学情况, 为临床应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters ACQUITY™ I-Class 超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); Sciex Triple Quad 5500 三重四级杆串联型质谱仪 (美国 AB SCIEX 公司); 十万分之一天平 AX205 (瑞士 Mettler Toledo 公司); 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); MX-S 型涡旋混合器 (美国 Scilogex 公司); Mill-Q II 型纯水仪 (美国 Millipore 公司); 超低温冰箱 (丹麦 Thermo Heto 公司)。

1.2 药品与试剂

对照品丹皮酚 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 20170105) 购自天津万象恒远科技有限公司; 咖啡酸 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 Y09J8C28349) 购自上海源叶生物技术有限公司; 2,4-二羟基苯乙酮 (丹皮酚的去甲基化产物 M1, 质量分数 $\geq 99\%$, 批号 C10012347) 购自上海麦克林生物技术有限公司; 2,5-二羟基-4-甲氧基苯乙酮 (丹皮酚的羟基化产物 M2) (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 DST181031-059) 购自成都德斯特生物技术有限公司; 2-羟基苯乙酮-

4-O-葡萄糖醛酸结合物 (丹皮酚的葡萄糖醛酸化产物 M3) 和 2-羟基-4-甲氧基苯乙酮-5-O-葡萄糖醛酸结合物 (丹皮酚的葡萄糖醛酸化产物 M4) (质量分数 $\geq 98\%$, 实验室自制); 牡丹皮药材购于同仁堂药店 (天津塘沽); 甲醇、乙腈均为色谱纯, 美国 Fisher Scientific 公司; 甲酸, 德国 CNW 公司; EDTA- Na_2 (批号 830C0610) 购自 Solarbio 公司; 纯净水购自屈臣氏公司。

1.3 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 210~230 g, 由北京维通利华实验动物有限公司提供, 合格证号 SCXK (京) 2016-006。

2 方法与结果

2.1 牡丹皮提取物的制备

称取 500 g 牡丹皮药材, 用 5 倍量 75%乙醇回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 将提取液进行减压浓缩后冻干, 将粉末研磨混匀后, 得到牡丹皮提取物, 计算提取率为 28.1%, 经 HPLC 测定牡丹皮提取物中丹皮酚的质量分数为 2.32%。

2.2 丹皮酚及其代谢产物的 UPLC-MS/MS 分析

2.2.1 色谱条件 分析柱为 Acquity UPLC BEH- C_{18} (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm), 保护柱为 Acquity UPLC BEH C_{18} (5 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1%甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~0.5 min, 95% A; 0.5~1.0 min, 50% A; 1.0~1.8 min, 50% A; 1.8~2.2 min, 5% A; 2.2~3.8 min, 5% A; 3.8~4.0 min, 95% A; 4.0~5.0 min, 95% A; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 2 μL ; 样品室温度为 12 $^{\circ}\text{C}$; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.2 质谱条件 AB Sciex Triple Quad 5500 三重四级杆质谱, 负离子模式, 多反应监测 (MRM) 扫描模式; 离子源为电喷雾离子源 (ESI); 气帘气 (CUR) 206.85 kPa (30 psi); 碰撞气 (CAD) 55.16 kPa (8 psi); 喷雾电压 (IS) -4 500 V; 毛细管加热温度 500 $^{\circ}\text{C}$; 雾化气 (GS1) 344.75 kPa (50 psi); 辅助加热气 (GS2) 344.75 kPa (50 psi)。用于定量分析检测的离子对 ($\text{Q1} \rightarrow \text{Q3}$) 为 m/z 164.9 $\rightarrow$ 122.0 [丹皮酚, 去簇电压 (DP) -90 V; 射入电压 (EP) -10 V; 碰撞电压 (CE) -30 V; 碰撞室出口电压 (CXP) -15 V]; m/z 150.9 $\rightarrow$ 135.2 (M1, DP -90 V; EP -10 V; CE -24 V; CXP -15 V); m/z 181.0 $\rightarrow$ 122.9 (M2, DP -90 V; EP -10 V; CE -36 V; CXP -15 V); m/z 327.2 $\rightarrow$ 151.1 (M3, DP -90 V; EP -10 V; CE -35

V; CXP-15 V); m/z 357.1→165.9 (M4, DP-90 V; EP-10 V; CE-40 V; CXP-15 V); m/z 178.0→133.9 (内标, 咖啡酸, DP-90 V; EP-10 V; CE-30 V; CXP-15 V)。

2.2.3 对照品溶液与内标溶液的配制 分别精密称取丹皮酚、M1、M2、M3、M4 对照品适量, 分别用 50% 甲醇水溶解, 分别配制成 1.0 mg/mL 的储备液。分别精密吸取丹皮酚和 M1~M4 储备液适量, 用 50% 乙腈水配制成混合对照品溶液, 混合溶液中 M1 的质量浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$, M2~M4 质量浓度为 10.0 $\mu\text{g/mL}$, 丹皮酚的质量浓度为 20.0 $\mu\text{g/mL}$ 。将混合对照品溶液进行系列稀释, 配制一系列质量浓度的混合对照品工作液, 用于配制标准曲线样品及质量控制样品。精密称取咖啡酸适量, 用 50% 甲醇水溶解至 1 mg/mL 储备液, 再精密吸取咖啡酸储备液 10 μL 用 50% 甲醇水稀释至 1 mL, 得到咖啡酸中间储备液, 精密吸取适量的中间储备液用乙腈溶液 (0.1% 甲酸) 配制成质量浓度为 10 ng/mL 的内标溶液。

2.2.4 血浆样品的收集 取雄性 SD 大鼠 18 只, 适应性喂养 1 周, 期间自由饮水进食, 随机分为 3 组 ($n=6$), 于给药前禁食 12 h, 分别 ig 给予低、中、高剂量 (0.5、1.0、2.0 g/kg) 的牡丹皮 0.5% CMC-Na 混悬液, 于给药前和给药后 0.083、0.167、0.25、0.5、1、1.5、2、4、6、8、12、24 h 从大鼠眼底静脉丛采血 300 μL , 置于预先加入 EDTA- Na_2 的 1.5 mL 的 EP 管中, 8 000 r/min 离心 10 min 后, 取血浆于 -80°C 下储存, 待分析。

2.2.5 血浆样品的处理 精密吸取血浆样品 50 μL , 精密加入 200 μL 含内标 (10 ng/mL 咖啡酸) 的乙腈 (0.1% 甲酸), 涡旋 2 min 混匀后, 14 000 r/min 离心 10 min, 精密吸取上清液 100 μL , 精密加入 100 μL 纯水进行稀释, 涡旋 2 min 混匀, 取 2 μL 上清液进样分析。

2.2.6 排泄样品的收集 取雄性 SD 大鼠 12 只, 适应性喂养 1 周, 期间自由饮水进食, 随机分为 2 组 ($n=6$)。尿液和粪便样品的收集: 于给药前禁食 12 h, 中剂量 1.0 g/kg 的牡丹皮提取物 0.5% CMC-Na 混悬液 ig 给予后, 将大鼠安置于代谢笼内。分别采集 0~4、4~8、8~12、12~24、24~36、36~48 h 时间段内的大鼠尿液样品, 记录各时间段体积; 同时, 收集 0~12、12~24、24~48 h 时间段内的大鼠粪便样品。胆汁样品的收集: 大鼠 ig 给予 1.0 g/kg 的牡丹皮提取物后, 用 20% 乌拉坦进行麻醉, 由腹

中线切开腹腔, 分离出大鼠胆管, 进行插管手术, 分别采集 0~2、2~4、4~8、8~12、12~24 h 时间段内的大鼠胆汁样品, 并记录体积。

2.2.7 排泄样品的处理 取尿液和胆汁样品适量, 用空白大鼠尿液和胆汁分别稀释 10 倍和 25 倍, 稀释混合后的终体积均为 50 μL 。大鼠粪便样品冷冻干燥后, 精密称质量, 记录大鼠粪便样品的质量。精密称量大鼠粪便样品适量, 按照 0.1 g/mL 的比例加入适量甲醇, 涡旋 2 min, 在超声提取仪中超声提取 0.5 h, 经 4 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液 50 μL 。其余操作同“2.2.5”项下操作。

2.2.8 方法学考察 方法学验证包括专属性、线性关系、准确度与精密度、提取回收率、基质效应、稳定性考察, 各项均按照《中国药典》2015 年版关于“生物样品定量分析方法验证指导原则”完成。

(1) 专属性考察: 取 6 个不同来源的空白血浆 50 μL , 除用乙腈代替咖啡酸内标工作液外, 其他按照“2.2.5”项下操作, 得到空白血浆样品; 空白血浆中加入 10 μL 混合对照品工作液, 样品按“2.2.5”项下操作, 得到空白血浆+对照品溶液; 同时将大鼠 ig 给予牡丹皮提取物 (0.5 g/kg) 后采集的血浆样品进行处理, 各溶液按照“2.2.1”项条件进样分析, 得到 3 者的色谱图, 进行对比分析, 考察分析物是否与杂峰完全分离, 以检查有无干扰。色谱图见图 1。空白血浆、空白血浆+混合对照品样品、ig 给予牡丹皮提取物后血浆样品色谱图中均未见血浆基质中有内源性物质对丹皮酚、M1~M4 及咖啡酸 (内标) 有干扰, 说明该分析方法具有良好的专属性。

(2) 标准曲线和线性关系考察: 精密吸取空白大鼠血浆 50 μL , 依次加入系列质量浓度的混合对照品工作液 10 μL , 制备成系列质量浓度的标准血浆样品 (丹皮酚质量浓度为 3.0、2.0、1.6、1.2、0.8、0.4、0.2、0.1 $\mu\text{g/mL}$; M2、M3、M4 质量浓度为丹皮酚各浓度点的 1/2; M1 质量浓度为丹皮酚各浓度点的 1/20), 按照“2.2.5”项下操作处理, 按照“2.2.1”项条件进样分析, 以血浆中各分析物的质量浓度为横坐标 (X), 待测物与内标的峰面积比值为纵坐标 (Y), 用加权回归方法进行回归, 选用权重因子为 $1/X^2$ 。结果丹皮酚的回归方程为 $Y=7.71 \times 10^{-6} X + 2.40 \times 10^{-4}$ ($r^2=0.998$); M1 的回归方程为 $Y=1.12 \times 10^{-2} X + 3.52 \times 10^{-3}$ ($r^2=0.996$); M2 的回归方程为 $Y=5.63 \times 10^{-5} X + 9.11 \times 10^{-4}$ ($r^2=0.997$);

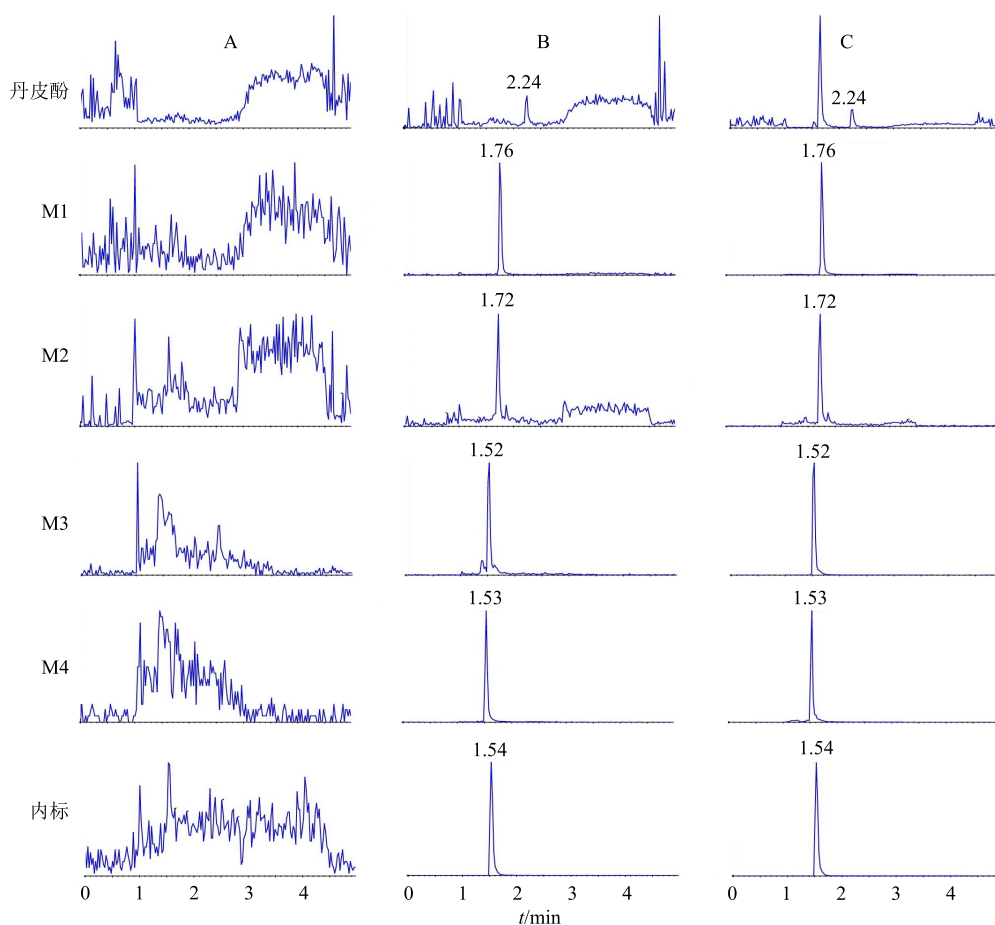


图 2 空白血浆 (A)、空白血浆+对照品 (B)、大鼠 ig 给予牡丹皮提取物后的血浆样品 (C) 离子色谱图

Fig. 2 Typical MRM chromatograms of blank rat plasma sample(A), blank rat plasma spiked with standard solution(B), and plasma sample after oral administration (C)

M3 的回归方程为 $Y=7.45 \times 10^{-4} X+0.023$ ($r^2=0.999$); M4 的回归方程为 $Y=1.58 \times 10^{-3} X+5.56 \times 10^{-3}$ ($r^2=0.999$)。结果显示, 丹皮酚、M1、M2~M4 分别在 $0.1 \sim 3.0 \mu\text{g/mL}$ 、 $5 \sim 150 \text{ ng/mL}$ 、 $50 \sim 1\,500 \text{ ng/mL}$ 线性关系良好, 定量下限分别为 100、5、50 ng/mL。

(3) 准确度与精密度考察: 精密吸取大鼠空白血浆 $50 \mu\text{L}$, 依次加入混合对照品工作液, 配制成最低定量限质控样品 (LLOQ)、低质量浓度质控样品 (LQC)、中质量浓度质控样品 (MQC)、高质量浓度质控样品 (HQC) 4 个质量浓度的质控样品, 丹皮酚在最低定量限、LQC、MQC、HQC 质控样品中的质量浓度分别为 100、300、1 200、2 400 ng/mL, M2、M3、M4 在质控样品中的质量浓度为丹皮酚各浓度点的 1/2; M1 在质控样品中的质量浓度为丹皮酚各浓度中的 1/20。按照“2.2.5”项下操作, 按照“2.2.1”项条件进样分析, 连续测定 3 d ($n=6$), 由随行标准曲线计算质控样品质量浓度,

进而计算日内准确度和精密度, 以及日间准确度和精密度。以血浆为基质的 LLOQ、LQC、MQC、HQC 的质控样品中 ($n=6$), 丹皮酚和 M1~M4 的日内准确度在 $-12.00\% \sim 14.03\%$, 日内精密度 RSD 值均小于 8.14%; 日间准确度在 $-7.73\% \sim 9.04\%$, 日间精密度 RSD 值均小于 10.82%。结果表明, 本方法的精密度和准确度符合生物样品分析要求。

(4) 基质效应: 采用质量浓度为 LQC 和 HQC 的质控样品 ($n=6$) 来考察大鼠血浆基质效应。精密吸取大鼠空白血浆 $50 \mu\text{L}$, 加入 $10 \mu\text{L}$ LQC 和 HQC 对应浓度的混合对照品工作液, 按照“2.2.5”项下操作, 按照“2.2.1”项条件进样分析, 统计每个样品中待测物的峰面积 (A_1)。另以 $50 \mu\text{L}$ 纯水代替空白血浆, 其余操作同上, 统计每个样品中待测物的峰面积 (A_2)。以 A_1 与 A_2 的比值为基质效应, 结果在 LQC 和 HQC 质控样品中 ($n=6$), 丹皮酚和 M1~M4 在大鼠血浆中的基质效应在 $82.10\% \sim$

117.60%, RSD 值小于 12.73。结果表明, 本方法可有效地避免基质对分析物测定的影响。

(5) 提取回收率: 采用质量浓度为 LQC、MQC 和 HQC 的质控样品 ($n=4$) 来考察提取回收率。精密吸取空白大鼠血浆 50 μL , 加入 10 μL LQC、MQC 和 HQC 对应浓度的混合对照品工作液, 按“2.2.5”项下操作, 按照“2.2.1”项条件进样分析, 统计每个样品中待测物的峰面积 (A_1)。另取 50 μL 稀释剂 (乙腈-水 1:1) 代替大鼠空白血浆, 加入 10 μL LQC、MQC 和 HQC 对应质量浓度的混合对照品工作液, 然后按相同的操作步骤处理样品, 统计每个样品中待测物的峰面积 (A_3)。以 A_1 与 A_3 的比值为提取回收率, 结果 LQC、MQC、HQC 质控样品中 ($n=4$), 丹皮酚和 M1~M4 的提取回收率为 89.88%~116.56%, RSD 均小于 13.32%, 符合生物样品分析要求。

(6) 稳定性: 采用质量浓度为 LQC、MQC 和 HQC 的质控样品 ($n=3$) 来考察冻融稳定性、 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下储存 30 d 的长期稳定性、处理前样品室温放置 6 h 稳定性、处理后样品在自动进样器中 ($12\text{ }^\circ\text{C}$) 放置 24 h 稳定性。精密吸取空白大鼠血浆 50 μL , 加入 10 μL LQC、MQC 和 HQC 对应质量浓度的混合对照品工作液, 在相应环境下放置规定时间后, 按照“2.2.5”项下操作, 按照“2.2.1”项条件进样分析, 由标准曲线计算每个待测物的实测质量浓度。

结果由当日随行标准曲线计算每个待测物的实测质量浓度, RSD 值均小于 15%, 稳定性考察结果符合生物样品测定对于稳定性的要求。

2.3 大鼠 ig 牡丹皮提取物后丹皮酚及其代谢产物血浆药动力学研究

雄性 SD 大鼠单次 ig 给予不同剂量 (0.5、1.0、2.0 g/kg) 牡丹皮提取物的 CMC-Na 混悬液后, 各时间点血浆中丹皮酚及其 4 种代谢产物的平均血药浓度-时间曲线见图 2, 利用 DAS 2.0 计算相关的药理学参数结果见表 1。不同给药组的 PK 数据利用 SPSS Statistics 21.0 进行 One-way ANOVA 检验。

2.4 大鼠 ig 牡丹皮提取物后丹皮酚及其代谢产物排泄动力学研究

雄性 SD 大鼠单次 ig 给予 1.0 g/kg 的牡丹皮提取物 CMC-Na 混悬液后按时间段收集大鼠的尿液、胆汁和粪便, 在排泄样品中未检测到丹皮酚, 而丹皮酚的代谢产物 M1~M4 在尿液和胆汁中的暴露量较大。在大鼠的粪便中只检测到少量的 M1, 在 0~48 h 大鼠的粪便累积排泄量达 $(1.71 \pm 1.21)\text{ }\mu\text{g}$ 。代谢产物 M1~M4 在大鼠的尿液和胆汁中排泄速率-时间曲线和累积排泄量-时间曲线见图 3。1.0 g/kg 牡丹皮提取物的给药剂量相当于丹皮酚的给药剂量约 25 mg/kg, 计算各代谢产物在不同排泄途径下与提取物中丹皮酚总给药量的累积排泄百分比 (物质的量比), 结果见表 2。

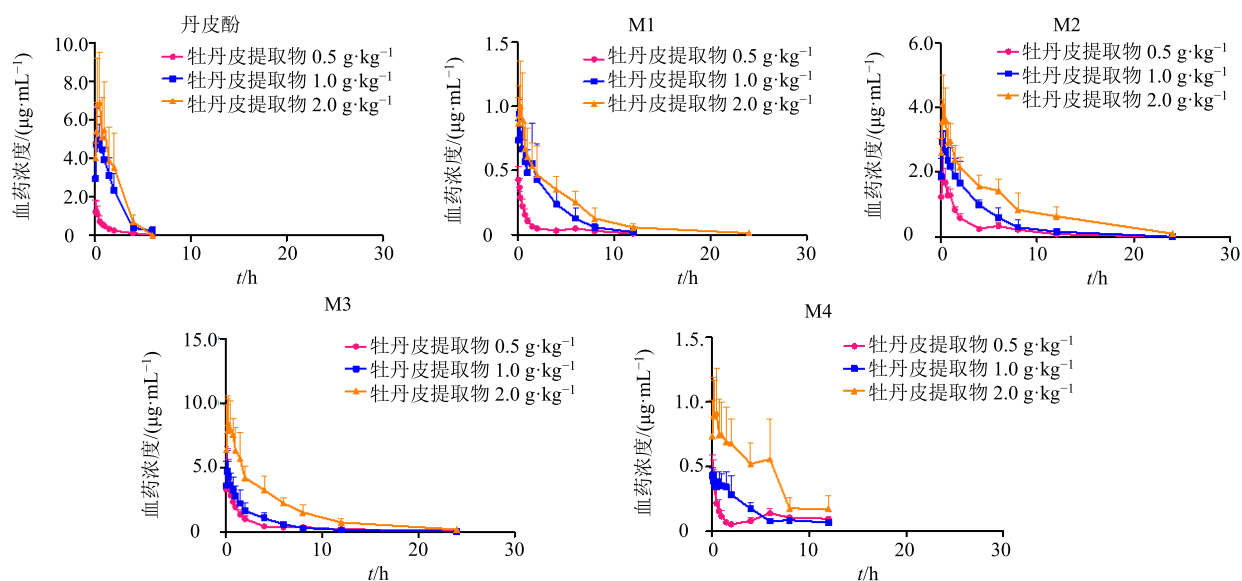


图2 丹皮酚及其代谢产物 M1~M4 的血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves of paeonol and metabolites M1—M4 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表 1 丹皮酚及其代谢产物 M1~M4 药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 1 Pharmacokinetic parameters of paeonol and metabolites M1—M4 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分析物	剂量/(g·kg ⁻¹)	<i>t</i> _{1/2} /h	<i>t</i> _{max} /h	<i>C</i> _{max} /(μg·L ⁻¹)	<i>AUC</i> _{0-∞} /(μg·h·L ⁻¹)	<i>AUC</i> _{0-∞} /(μg·h·L ⁻¹)	<i>MRT</i> _{0-∞} /h
丹皮酚	0.5	1.16±0.37	0.15±0.08	1 390.50±590.41	1 490.24±229.11	1 644.49±175.25	1.20±0.18
	1.0	1.19±0.45	0.33±0.19	5 565.00±1 292.76**	10 822.12±1 419.71**	11 220.13±1 526.07	1.50±0.23
	2.0	1.24±0.35	0.31±0.13	7 415.00±2 295.00**	13 865.94±6 542.33**	16 131.90±6 456.26	1.28±0.30
M1	0.5	4.44±1.00	0.08±0.00	428.25±103.45	555.52±82.01	675.18±131.69	2.75±0.38
	1.0	2.12±0.98	0.17±0.00	943.50±108.00**	2 527.34±678.41**	2 599.07±666.83	2.92±0.70
	2.0	3.50±1.31	0.21±0.07**	1 057.69±324.23**	3 793.79±807.14**▲	3 910.81±780.27	4.34±1.21*▲
M2	0.5	3.01±0.53	0.25±0.13	1 888.33±735.27	4 596.03±735.98	5 121.18±567.71	2.91±0.49
	1.0	2.61±1.30	0.25±0.13	3 066.67±358.76*	10 185.20±1 188.12**	10 858.96±928.06	3.10±0.82
	2.0	3.80±1.09	0.25±0.00	4 113.33±108.37**▲	20 190.30±5 095.93**▲	21 172.39±5 096.93	5.53±1.64**▲
M3	0.5	7.65±2.39	0.33±0.29	3 647.50±2 997.39	9 531.28±2 607.00	10 584.51±2 868.87	5.17±1.83
	1.0	2.60±0.69	0.19±0.04	4 735.00±1 596.05	11 730.17±2 606.39	12 240.80±2 414.90	2.96±0.65
	2.0	4.47±0.85	0.25±0.00	8 426.67±2 151.22*	39 213.95±8 625.50**▲	40 163.74±8 290.78	5.22±0.49
M4	0.5	6.18±0.31	0.08±0.00	431.33±158.53	1 191.38±408.12	2 252.26±481.37	5.06±1.27
	1.0	3.07±1.00	0.08±0.00	453.67±67.26	1 262.60±145.10	1 605.69±158.14	2.59±0.50
	2.0	4.78±1.74	0.52±0.37	1 034.80±273.14**▲	5 214.55±1 561.57**▲	6 624.24±2 323.39	4.18±0.63*▲

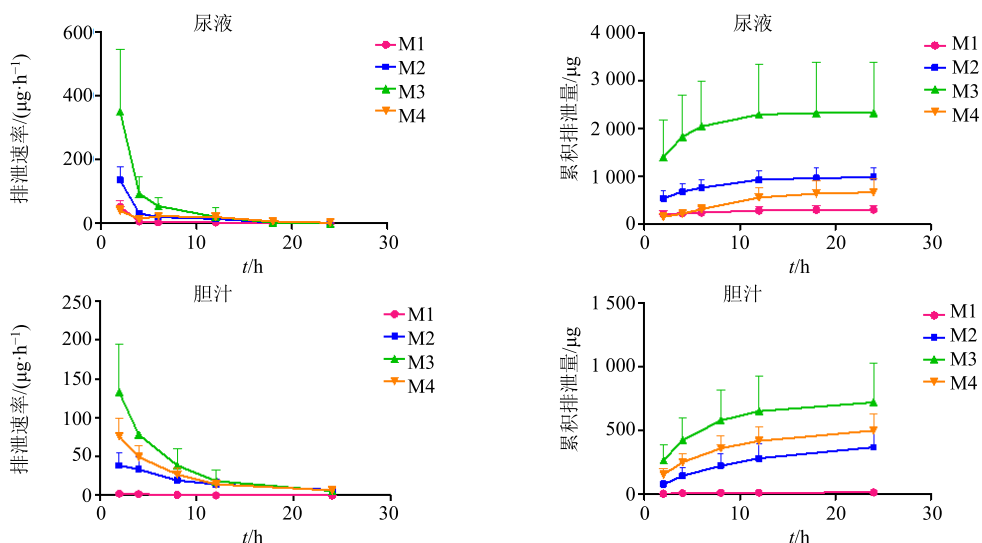
与低剂量组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01; 与中剂量组比较: ▲*P*<0.05 ▲▲*P*<0.01**P*<0.05 ***P*<0.01 vs low dose group; ▲*P*<0.05 ▲▲*P*<0.01 vs middle dose group图 3 代谢产物 M1~M4 在大鼠尿液和胆汁中排泄速率-时间曲线和累积排泄量-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 3 Mean urinary and bile excretion rate-time profile and accumulative amount-time profile of metabolites M1—M4 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 2 代谢产物 M1~M4 在尿液、胆汁、粪便中的累积排泄百分比 (物质的量比)

Table 2 Cumulative excretion percentage of metabolites M1—M4 in urine, bile and feces (mole percent)

代谢物	累积排泄百分比 (物质的量比)/%		
	尿液	胆汁	粪便
M1	5.85±1.73	0.28±0.18	0.04±0.02
M2	15.64±3.17	5.85±2.28	—
M3	20.54±9.25	6.34±2.65	—
M4	5.41±2.30	4.02±1.05	—
合计	47.44	16.49	0.04

3 讨论

本研究首先针对大鼠 ig 不同剂量 (0.5、1.0、2.0 g/kg) 牡丹皮提取物后, 对牡丹皮中主要成分丹皮酚及其 4 种代谢产物进行了血浆药动学研究。丹皮酚的血药浓度分别在给药后 (0.15±0.08)、(0.33±0.19)、(0.31±0.13) h 时达到峰浓度 (1390.50±590.41)、(5 565.00±1 292.76)、(7 415.00±2 295.00) μg/L, 消除半衰期 *t*_{1/2} 分别为 (1.16±0.37)、(1.19±0.45)、(1.24±0.35) h, 3 个剂量组间的 *t*_{max} 和 *t*_{1/2}

差异无显著性 ($P>0.05$)。此外,随着给药剂量的增大, $C_{\max}$ 和 AUC_{0-t} 也逐渐增大,但与给药剂量不呈正比,中、高剂量组分别与低剂量组相比差异显著 ($P<0.01$),表明存在剂量依赖性。可见丹皮酚在大鼠体内呈现吸收快、消除快的特点,该特点与文献报道一致^[15]。分析 M1~M4 的药动学参数可知,丹皮酚在大鼠体内被吸收后进行快速代谢,其去甲基化、羟基化、葡萄糖醛酸化的代谢产物也均在给药后 1 h 内先后达峰浓度,但其 $t_{1/2}$ 与丹皮酚的 $t_{1/2}$ 相比均延长;代谢产物 M1~M4 在血浆中的暴露量为 $M3>M2>M4>M1$ 。据文献报道^[16],丹皮酚的口服生物利用度为 16%,推测丹皮酚可能会在胃肠壁或者肝脏内发生首关效应而被广泛代谢。

在尿液、胆汁和粪便样品中,未检测到丹皮酚,分析可能的原因有:(1)定量下限较高,丹皮酚以原型形式排泄的浓度较低;(2)丹皮酚通过胃肠道或者肝脏代谢被大量转化为与葡萄糖醛酸或者硫酸等结合的代谢产物,以 II 相代谢产物的形式主要经尿液排出体外。M3 的累积排泄量最大,M1 的累积排泄量最小,这也与血浆中 M1~M4 暴露量相符合;各代谢产物在 0~4 h 排泄速率最大,随后排泄速率大幅减缓;代谢产物 M1~M4 在 ig 给药 24 h 后累积排泄量趋于平缓,说明尿液和胆汁途径中排泄基本完全。

本研究通过给大鼠 ig 牡丹皮提取物,运用建立的 UPLC-MS/MS 生物样品分析方法,检测丹皮酚及其 4 种主要代谢产物的血浆暴露量以及排泄动力学,揭示丹皮酚能够被快速吸收并代谢,且快速清除,其以代谢产物的形式主要经尿液途径排出体外。据报道丹皮酚的代谢产物具有抗炎方面的作用^[17],这也说明不仅是丹皮酚还有其代谢产物也可能是牡丹皮的体内药效物质,代谢产物其他方面的药理作用及作用机制有待继续研究。因此,本研究为牡丹皮及丹皮酚的应用与开发提供了实验依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Rho S, Chung H S, Kang M, *et al.* Inhibition of production of reactive oxygen species and gene expression profile by treatment of ethanol extract of *Moutan Cortex Radicis* in oxidative stressed pc12 cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(4): 661-666.
- [3] Fu P K, Yang C Y, Tsai T H, *et al.* *Moutan Cortex Radicis* improves lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats through anti-inflammation [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(13): 1206-1215.
- [4] Li N, Fan L L, Sun G P, *et al.* Paeonol inhibits tumor growth in gastric cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(35): 4483-4490.
- [5] Sun G P, Wan X, Xu S P, *et al.* Antiproliferation and apoptosis induction of paeonol in human esophageal cancer cell lines [J]. *Dis Esophagus*, 2008, 21(8): 723-729.
- [6] Lee S, Lee H. Inhibitory effects of paeonia suffruticosa andrews extracts on VEGF binding to VEGF receptor [J]. *Nat Prod Sci*, 2007, 13(2): 128-131.
- [7] Dan H, Zhang L, Qin X, *et al.* *Moutan Cortex* extract exerts protective effects in a rat model of cardiac ischemia/reperfusion [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2016, 94(3): 245-250.
- [8] Kim H G, Park G, Piao Y, *et al.* Effects of the root bark of *Paeonia suffruticosa* on mitochondria-mediated neuroprotection in an MPTP-induced model of Parkinson's disease [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 65: 293-300.
- [9] Shon Y H, Nam K S. Protective effect of *Moutan Cortex* extract on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 90(2/3): 415-419.
- [10] Trung T N, Hien T T, Dao T T, *et al.* Selected compounds derived from *Moutan Cortex* stimulated glucose uptake and glycogen synthesis via AMPK activation in human HepG2 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(2): 417-424.
- [11] 吴桂莹, 亓玉玲, 郝宝燕, 等. 丹皮酚衍生物及其药理学研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(4): 1001-1006.
- [12] 耿 帅, 赵育林, 曾 凯, 等. 丹皮酚的研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志, 2016, 38(5): 310-313.
- [13] 尚雯倩, 张艾民, 华玉双, 等. 丹皮酚抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(9): 2864-2869.
- [14] Ding L Q, Qiu T Y, Liu Z X, *et al.* Systematic characterization of the metabolites of paeonol in rats using ultra performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry with an integrative strategy [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 10(1065/1066): 70-78.
- [15] Xie Y, Zhou H, Wong Y F, *et al.* Study on the pharmacokinetics and metabolism of paeonol in rats treated with pure paeonol and an herbal preparation containing paeonol by using HPLC-DAD-MS method [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 46(4): 748-756.
- [16] Kwon M H, Jeong J S, Ryu J, *et al.* Simultaneous determination of saikosaponin a, paeonol, and imperatorin, components of da-9805, in rat plasma by lc-ms/ms and application to a pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 10(1068/1069): 289-296.
- [17] Jin X, Wang J, Xia Z, *et al.* Anti-inflammatory and anti-oxidative activities of paeonol and its metabolites through blocking MAPK/ERK/p38 signaling pathway [J]. *Inflammation*, 2016, 39(1): 434-446.