

救必应总三萜主要成分在正常和高脂血症大鼠体内的药动学比较

杨 宝^{1,2}, 郑小芸², 轩申鑫², 阮清锋², 江诗琴², 崔 辉², 赵钟祥^{2*}

1. 湖北民族大学 医学部, 湖北 恩施 445000

2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 比较救必应总三萜主要成分在正常和高脂血症大鼠体内的药动学行为。**方法** SD 大鼠随机分为正常组和模型组, 模型组制备高脂血症大鼠模型, 各组单次 ig 救必应总三萜后于不同时间点取血。采用超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS) 测定大鼠血浆中冬青苷 O、oblonganoside I、rotundinoside C、ilexside II、长梗冬青苷、苦丁冬青苷 H、毛冬青皂苷 A₁、竹节参皂苷 IVa、救必应酸、rotundanonic acid、冬青素 A 的浓度, 将血药浓度和时间数据导入 DAS 2.0 软件中以非房室模型拟合药动学参数。**结果** 苷元的吸收速度显著高于三萜皂苷, 皂苷含糖的数目越多吸收入血的速度越慢。救必应酸在正常和高脂血症大鼠体内的达峰浓度 ($C_{\max}$) 分别为 3 257.9、2 173.8 nmol/L, 药-时曲线下面积 (AUC_{0-t}) 分别为 29 897.6、24 501.3 nmol·h/L, 远超其他 10 个成分的总和。与正常组相比, 模型组大部分成分的达峰时间 ($t_{\max}$) 延长, $C_{\max}$ 、 AUC_{0-t} 降低。**结论** 救必应总三萜主要成分在正常和高脂血症大鼠体内的药动学行为存在显著差异, 救必应酸为口服总三萜后大鼠体内的主要暴露成分。

关键词: 救必应; 总三萜; 超高效液相色谱串联质谱; 药动学; 高脂血症; 救必应酸; 长梗冬青苷; 苦丁冬青苷 H; 毛冬青皂苷 A₁; rotundanonic acid

中图分类号: R285.61

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)13-3905-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.13.014

Pharmacokinetic comparisons of main triterpenoids from *Ilicis Rotundae Cortex* in normal and hyperlipidemia rats

YANG Bao^{1,2}, ZHENG Xiao-yun², XUAN Shen-xin², RUAN Qing-feng², JIANG Shi-qin², CUI Hui², ZHAO Zhong-xiang²

1. Medical School, Hubei Minzu University, Enshi 445000, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To compare the pharmacokinetic behavior of main triterpenoids in normal and hyperlipidemia rats after ig total triterpenoids from *Ilicis Rotundae Cortex*. **Methods** SD rats were randomly divided into normal group and model group, a hyperlipidemia rat model was prepared in model group, and blood was taken at different time points after a single ig total triterpenoids in each group. Normal and hyperlipidemia rats were given a single oral dose of total triterpenoids of *Ilicis Rotundae Cortex*. The plasma concentrations of ilexoside O, oblonganoside I, rotundinoside C, ilexside II, pedunculoside, kudinoside H, ilexosaponin A₁, chikusetsusaponin IVa, rotundic acid, rotundanonic acid and ilexgenin A were quantified by UPLC-MS/MS method. The major pharmacokinetic parameters were calculated using non-compartmental analysis with DAS 2.0 software. **Results** The absorption rate of aglycone was significantly higher than that of saponin. The rate of absorption into blood was significantly reduced with the increasing of the number of sugar groups in saponin. The $C_{\max}$ of rotundic acid in normal and hyperlipidemia groups were 3 257.9 and 2 173.8 nmol/L, and the corresponding AUC_{0-t} were 29 897.6 and 24 501.3 nmol·h/L, respectively, which was far more than the sum of the other 10 analytes. Compared with normal group, the $t_{\max}$, $C_{\max}$ and AUC_{0-t} of most analytes in hyperlipidemia group were delayed or decreased. **Conclusion** The pharmacokinetics of 11 analytes exhibited significant differences between two

收稿日期: 2021-01-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82073987); 广东省自然科学基金资助项目 (2019A1515011261); 湖北民族大学博士启动基金项目 (DC2000000313)

作者简介: 杨 宝 (1991—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: ybsept@qq.com

*通信作者: 赵钟祥, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: zzx37@163.com

groups. Rotundic acid was the main compounds exposing in normal and hyperlipidemia rat plasma.

Key words: *Ilicis Rotundae Cortex*; total triterpenoids; UPLC-MS/MS; pharmacokinetics; hyperlipidemia; rotundic acid; pedunculoside; kudinoside H; ilexaponin A₁; rotundanonic acid

救必应为铁冬青 *Ilex rotunda* Thunb. 的干燥树皮, 是岭南地区常用中药材, 收载于《中国药典》2020 年版, 常用于治疗心脑血管和消化系统疾病^[1]。三萜是救必应的特征性组分, 在 70% 乙醇提取物中的含量超过 45.0%。总三萜为救必应治疗心脑血管疾病的活性部位, 具有较好的临床应用价值^[1-3]。口服药物发挥作用有 2 个重要的前提条件, 一是能够入血吸收且具有较高的暴露量和较长时间地维持起效浓度, 二是能够以原型或代谢产物的形式到达靶器官^[4]。由于中药所含成分相对复杂, 口服给药后可能是关键成分或组分发挥药效, 这些关键成分或组分是后续药效学研究的重点^[4]。因此, 开展中药多成分药动学研究是揭示中药药效物质基础的重要环节。机体处于疾病状态时, 与药物吸收、代谢、排泄相关的因素较正常状态存在较大改变, 从而影响口服给药后其活性成分的药动学行为^[5-6]。目前已有文献报道了救必应中长梗冬青苷和救必应酸在正常大鼠体内的药动学研究^[7-9], 本课题组前期也报道了正常大鼠单次 ig 救必应提取物后 6 个三萜类成分(冬青苷 O、rotundinoside C、长梗冬青苷、救必应酸、rotundanonic acid、冬青素 A) 的药动学行为^[10]。鉴于救必应一般应用于病理状态下, 且总三萜为其发挥调血脂作用的活性部位, 因此研究救必应总三萜在疾病状态下的药动学行为更具有实际意义。本研究在前期工作的基础上, 建立了测定大鼠血浆中 11 个救必应特征性三萜(冬青苷 O、oblonganoside I、rotundinoside C、ilexside II、长梗冬青苷、苦丁冬青苷 H、毛冬青皂苷 A₁、竹节参皂苷 IVa、救必应酸、rotundanonic acid、冬青素 A) 的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)方法, 并考察了以上成分在单次 ig 救必应总三萜的正常和高脂血症大鼠中的药动学行为, 以期对救必应的调血脂药效物质基础研究、新药开发和临床用药安全提供参考。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只, 4~6 周龄, 体质量 100~120 g, 购自广州中医药大学实验动物中心, 动物合格证号 44005800008525。动物饲养于实验动物中心屏障环境中, 动物室温度为(23±3)℃, 相

对湿度为(50±5)%, 光照周期为 12 h 亮/12 h 暗。动物实验经广州中医药大学动物实验伦理委员会批准(批准号 00203316)。

1.2 药材

救必应药材(批号 180101)购自广州至信中药饮片有限公司, 经广州中医药大学赵钟祥教授鉴定为冬青科植物铁冬青 *I. rotunda* Thunb. 的干燥树皮。

1.3 药品与试剂

对照品地高辛(批号 wkq16030204, 质量分数大于 99.0%) 购自维克奇科技有限公司; 冬青苷 O (1)、oblonganoside I (2)、rotundinoside C (3)、ilexside II (4)、长梗冬青苷 (5)、苦丁冬青苷 H (6)、毛冬青皂苷 A₁ (7)、竹节参皂苷 IVa (8)、救必应酸 (9)、rotundanonic acid (10)、冬青素 A (11) 为本课题组前期从救必应中分离并鉴定, 质量分数均大于 98.0%, 化学结构式见图 1; 色谱级乙腈、甲醇购自德国 Merck 公司; 质谱级甲酸购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 其他试剂均为分析纯; 普通饲料购自广州中医药大学实验动物中心; SPF 级高脂饲料购自广东省医学实验动物中心。

1.4 仪器

TripleTOF® 5600⁺ 质谱仪(美国 AB Sciex 公司); LC-30A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); 真空离心浓缩仪(德国 Eppendorf 公司); 高速冷冻离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司); RM2245 全自动轮转式切片机(德国 Leica 公司); cobas8000 全自动生化分析仪(瑞士 Roche 公司)。

2 方法

2.1 救必应总三萜的制备

取救必应药材 10.5 kg, 粉碎后以 75 L 70% 乙醇加热回流提取 2 h, 提取 4 次, 减压浓缩干燥后得总提取物 3200 g。取总提取物 1060 g 经大孔树脂分离, 依次用 75 L 蒸馏水、50 L 25% 乙醇、50 L 75% 乙醇和 50 L 95% 乙醇梯度洗脱, 回收 75% 乙醇洗脱液得 640 g 总三萜, 测得总三萜中化合物 1~11 的质量分数分别为 2.26、3.13、3.04、7.06、221.70、7.75、0.91、8.86、183.29、2.49、1.76 mg/g。

2.2 对照品溶液及内标溶液的制备

精密称取化合物 1~11 对照品适量, 分别用色

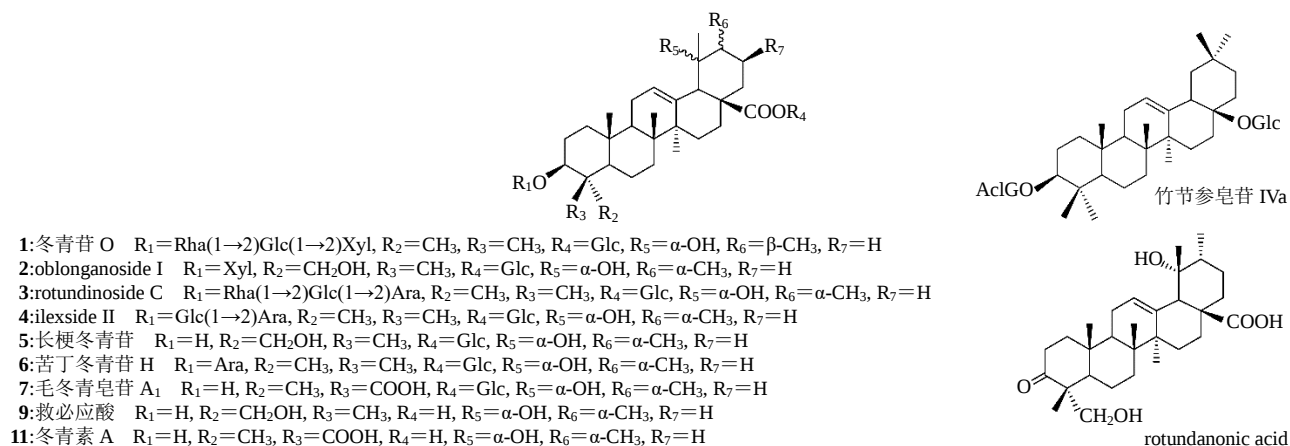


图 1 11 个三萜成分的结构式

Fig. 1 Chemical structures of 11 triterpenoids analytes

谱级甲醇配制成质量浓度为 0.1、0.1、0.1、0.1、2.0、0.5、0.1、0.5、2.0、0.1、0.1 mg/mL 的单一对照品储备液，临用前配制成系列质量浓度的混合物对照品工作液。取地高辛对照品适量，精密称定后用色谱甲醇配制成质量浓度为 0.02 mg/mL 的储备液，临用前稀释成质量浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的内标溶液。

2.3 色谱和质谱条件

2.3.1 色谱条件 Waters UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm)，流动相为 0.1%甲酸乙腈溶液 (A)-0.1%甲酸水溶液 (B)，梯度洗脱：0~1.0 min, 25%~30% A；1.0~3.5 min, 30% A；3.5~7.0 min, 30%~35% A；7.0~9.0 min, 35%~49% A；9.0~11.0 min, 49%~63% A；11.0~12.0 min, 63%~70% A。柱温为 50 $^{\circ}\text{C}$ ；体积流量为 0.4 mL/min；进样量为 5 μL 。

2.3.2 质谱条件 ESI 离子源；于负离子、选择反应监测扫描模式下采集数据；雾化气和辅助加热气

压力为 379.225 kPa；气帘气压力为 241.325 kPa；喷雾电压为 -4500 V。11 个成分和内标优化后的离子对和碰撞能参数见表 1。

2.4 动物分组与造模

20 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周后随机分为正常组和模型组，正常组给予普通饲料，模型组给予高脂饲料，造模期间自由饮水。6 周后采集正常和模型组大鼠血清，测定三酰甘油 (triglycerides, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 和高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 水平，结合肝脏苏木素-伊红 (HE) 染色 (每组 3 只) 评价高脂血症大鼠模型是否成功建立。

2.5 药动学研究

造模成功后，大鼠禁食 12 h，自由饮水。总三萜临用前以 4%羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 配制成混悬液，各组大鼠单次 ig 救必应总三萜 (1.2 g/kg)，

表 1 11 个三萜成分和内标的质谱参数

Table 1 Mass spectrum parameters of 11 triterpenoids analytes and IS

化合物	分子式	相对分子质量	质谱峰	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能/eV	t_R/min
冬青苷 O	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₂	1 074.56	[M+HCOO] ⁻	1 119.56	911.50	-36	3.12
oblonganoside I	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₄	782.45	[M+HCOO] ⁻	827.44	619.38	-43	3.13
rotundinoside C	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₂	1 074.56	[M+HCOO] ⁻	1 119.56	911.50	-36	3.59
ilexside II	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	928.50	[M+HCOO] ⁻	973.51	765.44	-38	4.51
长梗冬青苷	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₀	650.40	[M+HCOO] ⁻	695.40	487.34	-42	5.29
苦丁冬青苷 H	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₃	766.45	[M+HCOO] ⁻	811.45	603.38	-45	6.51
毛冬青皂苷 A ₁	C ₃₆ H ₅₆ O ₁₁	664.38	[M+HCOO] ⁻	709.38	501.32	-43	8.61
竹节参皂苷 IVa	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	794.45	[M+HCOO] ⁻	839.44	793.44	-31	8.65
救必应酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	488.35	[M-H] ⁻	487.34	469.33	-51	10.02
rotundanonic acid	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	486.33	[M-H] ⁻	485.32	455.32	-48	10.36
冬青素 A	C ₃₀ H ₄₆ O ₆	502.33	[M-H] ⁻	501.32	439.32	-56	11.13
地高辛 (内标)	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₄	780.43	[M+HCOO] ⁻	825.42	779.42	-34	4.03

ig 体积为 10 mL/kg。于给药前 (0 h) 及给药后 0.08、0.25、0.50、0.75、1.00、1.50、2.00、4.00、6.00、8.00、12.00、24.00、48.00 h 经眼眶后静脉丛取血 0.5 mL, 血样采集后置于肝素预处理的 EP 管中, 立即于 4 °C、4000 r/min 离心 10 min, 吸取上层血浆, 于 -80 °C 保存待测。

2.6 血浆样品的处理

取 100 μ L 自然融化的血浆, 加入 400 μ L 色谱级甲醇和 100 μ L 内标溶液, 涡旋 3 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液真空浓缩干燥, 残渣用 100 μ L 色谱级甲醇 (含 0.1% 甲酸) 复溶, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进样分析。

2.7 方法学考察

2.7.1 专属性试验 取空白血浆、空白血浆+定量限质量浓度对照品、给药血浆样品, 按“2.6”项下方法处理后进样分析, 提取各样品的离子流图。

2.7.2 线性关系与灵敏度试验 在空白大鼠血浆中加入适量系列质量浓度的混合对照品工作液, 使化合物 1~4、6~8、10、11 的终质量浓度为 200.00、100.00、50.00、25.00、12.50、6.25、3.13 ng/mL, 化合物 5 的终质量浓度为 400.00、200.00、100.00、50.00、25.00、12.50、6.25、3.13 ng/mL, 化合物 9 的终质量浓度为 2 000.00、1 000.00、500.00、250.00、125.00、62.50、31.25、15.63、7.81、3.91 ng/mL, 按“2.6”项下方法处理即得标准曲线样品, 进样分析, 以待测成分和内标峰面积的比值为纵坐标 (Y), 待测成分的质量浓度为横坐标 (X), 进行线性回归 (权重为 $1/x^2$)。另取混合对照品溶液稀释, 按“2.6”项下方法处理后进样分析, 以信噪比 10 作为定量限。

2.7.3 精密度与准确度试验 在空白大鼠血浆中加入适量的混合对照品工作液, 使化合物 1~4、6~8、10、11 的终质量浓度为 200.00、100.00、3.13 ng/mL, 化合物 5 的终质量浓度为 400.00、200.00、

6.25 ng/mL, 化合物 9 的终质量浓度为 2 000.00、125.00、7.81 ng/mL, 按“2.6”项下方法处理即得高、中、低质量浓度的质控样品, 平行制备各质量浓度的质控样本各 6 份, 进样分析, 连续进样 3 d 考察日内和日间的精密度和准确度。

2.7.4 稳定性试验 制备高、中、低质量浓度的质控样本各 6 份, 进行 -80 °C 储存 30 d、25 °C 放置 4 h、反复冻融 3 次试验, 进样分析, 计算各成分的质量浓度。

2.7.5 基质效应和提取回收率试验 取适量超纯水 (A) 和空白血浆 (B), 按照“2.6”项下方法处理后, 加入“2.2”项下系列质量浓度的对照品工作液, 制备相当于质控样品质量浓度 (高、中、低) 的样品。另取适量空白血浆, 按照“2.6”项下方法制备高、中、低 3 个质量浓度的质控样品 (C), 进样分析。以相同质量浓度样品 C 与 B 的峰面积比值计算提取回收率, B 与 A 的峰面积比值计算基质效应。

2.8 数据分析与处理

采用 DAS 2.0 软件计算药动力学参数, GraphPad Prism 7 软件绘制血药浓度-时间曲线。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。首先进行正态性检验, 对于不满足正态分布的两组计量资料之间的比较采用 Mann-Whitney U 检验; 对于满足正态分布的两组计量资料之间的比较采用两独立样本 t 检验。

3 结果

3.1 高脂血症大鼠模型的评估

如图 2-A 所示, 与正常组比较, 模型组大鼠血清中 TG、TC、LDL-C 水平显著升高 ($P < 0.01$), HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$)。如图 2-B 所示, 模型组大鼠肝脏细胞体积较正常组肿大, 呈网状或蜂窝状, 胞质内有大量油脂滴堆集, 形成脂肪空泡样病变, 提示大鼠高脂血症模型建立成功。

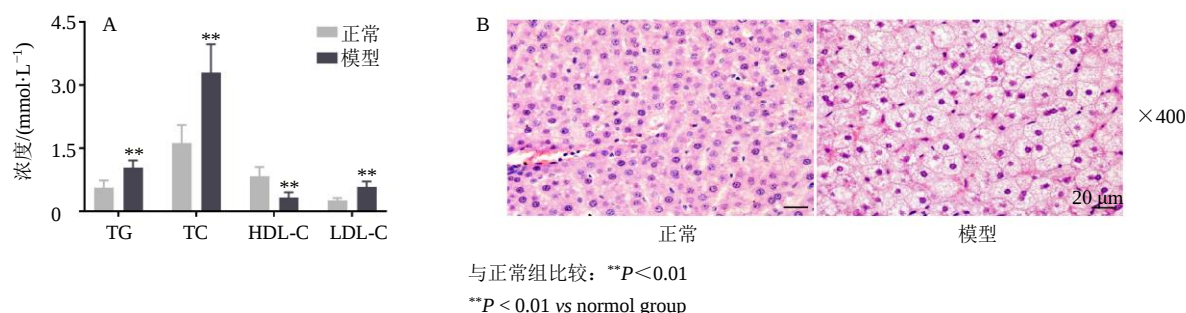


图 2 第 6 周大鼠的血清生化指标 (A) 及肝脏 HE 染色 (B)

Fig. 2 Serum biochemical parameters (A) and HE staining of liver sections (B) at 6th week

3.2 方法学考察

3.2.1 专属性试验 如图 3 所示, 内源性成分不干扰目标成分和内标的检测, 表明方法专属性良好。

3.2.2 线性关系与灵敏度试验 11 个成分的标准

曲线、相关系数、线性范围、定量限结果见表 2, 表明各成分的线性关系良好、灵敏度较高。

3.2.3 精密度与准确度试验 如表 3 所示, 11 个成分的精密度和准确度符合生物样品的测定要求, 日

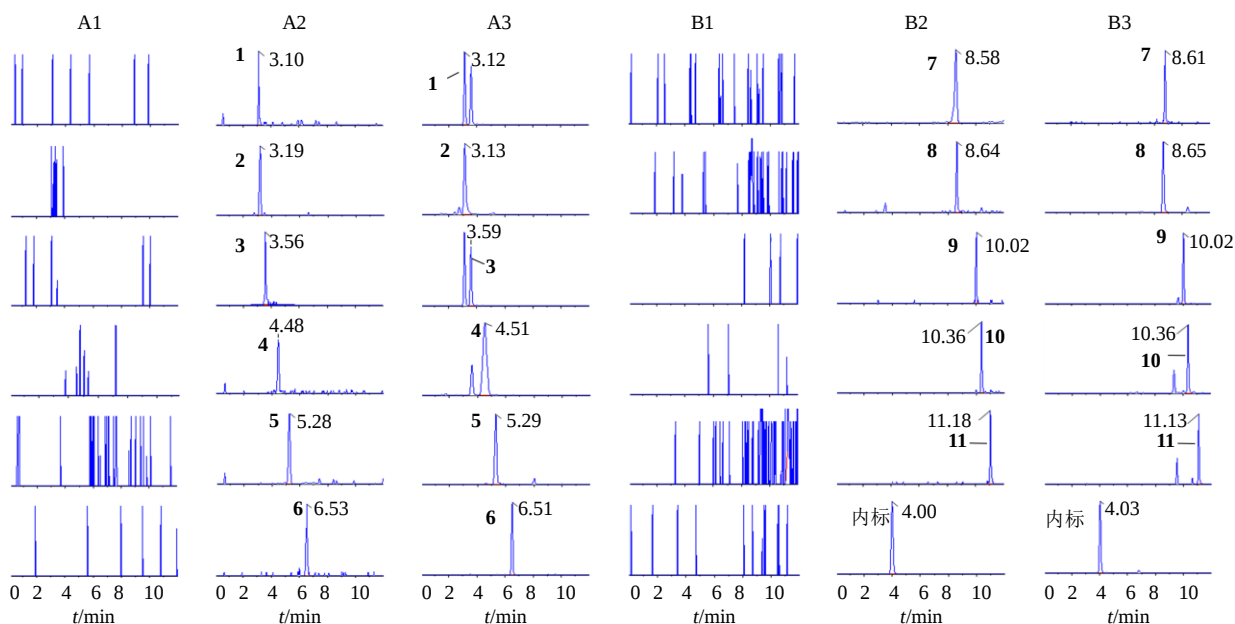


图 3 空白血浆 (A1、B1)、11 个成分定量限样品 (A2、B2) 以及给药后血浆样品 (A3、B3) 的提取离子流图

Fig. 3 Representative chromatograms of blank plasma (A1 and B1), blank plasma spiked with 11 analytes at limit of quantitation level (A2 and B2), and plasma sample from rats after oral administration of total triterpenoids (A3 and B3)

表 2 11 个成分的线性关系及定量限

Table 2 Calibration curves and limit of quantitation of 11 analytes

化合物	线性方程	r^2	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	定量限/(ng·mL ⁻¹)
冬青苷 O	$Y=0.007\ 84\ X+0.004\ 37$	0.995 4	2.4~200.0	2.4
oblonganoside I	$Y=0.008\ 27\ X+0.002\ 07$	0.996 3	2.6~200.0	2.6
rotundinoside C	$Y=0.007\ 19\ X+0.001\ 69$	0.996 6	2.4~200.0	2.4
ilexside II	$Y=0.008\ 04\ X+0.000\ 11$	0.997 8	1.7~200.0	1.7
长梗冬青苷	$Y=0.009\ 18\ X+0.046\ 94$	0.990 2	2.2~400.0	2.2
苦丁冬青苷 H	$Y=0.011\ 83\ X+0.003\ 50$	0.997 6	3.0~200.0	3.0
毛冬青皂苷 A ₁	$Y=0.009\ 13\ X+0.008\ 58$	0.994 8	1.9~200.0	1.9
竹节参皂苷 IVa	$Y=0.013\ 45\ X+0.002\ 02$	0.998 6	2.3~200.0	2.3
救必应酸	$Y=0.003\ 56\ X+0.002\ 09$	0.997 1	2.9~2 000.0	2.9
rotundanonic acid	$Y=0.002\ 84\ X+0.000\ 93$	0.996 0	2.1~200.0	1.3
冬青素 A	$Y=0.022\ 82\ X+0.058\ 68$	0.996 6	2.1~200.0	2.1

表 3 11 个成分在大鼠血浆中的日内和日间精密度、准确度以及提取回收率和基质效应考察 (n = 6)

Table 3 Intra- and inter-day precisions and accuracies, extraction recoveries and matrix effects of 11 analytes in rat plasma (n = 6)

化合物	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	精密度/%		准确度/%		回收率/%	基质效应/%
		日内	日间	日内	日间		
冬青苷 O	200.00	2.6	3.4	4.7	4.2	92.6±12.9	98.9±3.4
	25.00	2.5	4.5	0.1	1.5	89.9±9.7	91.7±6.7
	3.13	4.6	6.7	7.5	3.7	88.8±4.7	85.7±4.5
oblonganoside I	200.00	2.5	8.4	-13.6	-11.0	89.1±6.0	108.0±4.6
	25.00	2.6	3.9	5.8	4.8	98.4±6.7	96.8±6.9
	3.13	7.6	8.3	-4.7	-2.0	91.5±9.1	85.8±2.5
rotundinoside C	200.00	5.7	9.5	-13.9	-12.8	88.6±7.9	94.1±4.7
	25.00	7.1	10.8	-14.9	-10.4	94.8±9.6	89.5±6.2
	3.13	4.5	13.5	0.4	-6.5	86.0±10.6	90.5±1.7

续表 3

化合物	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	精密度/%		准确度/%		回收率/%	基质效应/%
		日内	日间	日内	日间		
ilexside II	200.00	2.8	3.4	-0.4	-2.7	89.2±11.3	92.4±6.1
	25.00	4.3	7.3	-3.1	-5.2	95.5±11.0	101.3±9.4
	3.13	7.8	7.0	12.3	13.0	88.2±8.7	86.0±2.1
长梗冬青苷	400.00	3.9	6.3	-14.0	-13.0	86.7±10.2	102.4±1.8
	50.00	2.0	4.5	-10.9	-10.9	90.5±11.3	95.7±13.6
	6.25	7.8	7.6	11.7	11.6	88.7±4.3	89.8±2.3
苦丁冬青苷 H	200.00	7.8	8.3	-7.3	-9.3	96.5±12.6	87.2±10.5
	25.00	5.6	12.4	-3.6	-10.1	94.6±9.9	101.9±7.8
	3.13	12.6	10.6	-10.6	-6.7	96.7±9.4	87.7±5.5
毛冬青皂苷 A ₁	200.00	3.0	5.2	-2.1	-2.0	93.9±7.6	95.0±8.5
	25.00	4.9	4.7	-5.3	-5.6	88.3±11.0	93.6±7.3
	3.13	8.0	10.8	3.6	-1.5	101.2±3.7	88.9±2.5
竹节参皂苷 IVa	200.00	10.1	7.8	-3.8	-3.1	105.1±13.3	92.4±12.9
	25.00	4.6	4.6	-6.1	-7.9	86.4±10.8	97.5±2.4
	3.13	9.8	8.1	-3.2	-2.8	87.4±11.9	88.0±2.2
救必应酸	2 000.00	6.4	6.5	-8.6	-5.6	93.8±10.4	88.3±7.2
	125.00	9.8	9.3	-12.0	-12.6	94.8±10.6	96.2±1.6
	7.81	9.1	8.2	8.0	10.3	93.3±12.1	110.5±4.2
rotundanonic acid	200.00	2.4	4.2	-8.6	-8.2	97.3±13.6	106.5±9.2
	25.00	7.4	6.0	4.4	2.3	101.6±14.9	100.9±11.8
	3.13	10.2	12.6	1.9	3.7	95.8±10.4	95.7±6.6
冬青素 A	200.00	7.4	8.9	-12.3	-12.4	88.3±3.5	94.4±2.6
	25.00	5.4	6.8	8.9	8.0	90.1±9.8	97.2±8.3
	3.13	4.6	7.8	-0.5	3.3	102.6±8.5	87.2±3.3

内和日间精密度的相对偏差分别小于 12.6%、13.5%，日内和日间准确度的相对误差分别为 -14.9%~12.3%、-13.0%~13.0%。

3.2.4 稳定性试验 如表 4 所示，11 个成分在上述条件下的稳定性良好，相对偏差小于 15.0%，准确度为 -14.8%~14.7%。

表 4 11 个成分在大鼠血浆中稳定性考察 (n = 6)

Table 4 Stability of 11 analytes in rat plasma under different storage conditions (n = 6)

化合物	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	25 °C 放置 4 h		-80 °C 储存 30 d		反复冻融 3 次	
		精密度/%	准确度/%	精密度/%	准确度/%	精密度/%	准确度/%
冬青苷 O	200.00	2.6	4.7	8.0	-3.9	7.1	-10.9
	25.00	2.3	-0.5	9.2	-7.0	5.2	-13.9
	3.13	4.6	7.5	5.4	-9.7	9.6	-2.8
oblonganoside I	200.00	5.8	-6.6	7.0	-6.1	4.2	-13.9
	25.00	7.8	8.2	12.9	-1.7	6.5	-4.3
	3.13	13.6	10.8	9.1	2.0	8.8	-9.9
rotundinoside C	200.00	4.0	-10.4	8.1	-8.6	7.3	-5.9
	25.00	12.7	1.6	7.6	-14.8	12.9	-7.0
	3.13	15.0	-6.8	7.2	-11.2	9.9	-4.8
ilexside II	200.00	6.4	-5.6	14.3	-10.1	3.7	-13.5
	25.00	5.6	-10.1	6.4	-11.9	7.0	-11.9
	3.13	3.2	-12.0	11.8	14.7	10.9	13.9
长梗冬青苷	400.00	3.6	-8.3	8.3	-8.6	10.3	-9.8
	50.00	9.7	-9.6	14.2	6.7	8.9	-5.3
	6.25	12.2	-6.4	8.8	-6.4	11.7	-4.5
苦丁冬青苷 H	200.00	6.8	-10.6	9.3	-0.7	7.2	-9.1
	25.00	7.3	-14.1	6.6	-10.0	11.1	-14.1
	3.13	9.1	-1.9	9.5	4.0	9.6	-14.7
毛冬青皂苷 A ₁	200.00	8.0	3.7	3.5	-9.1	4.7	2.4
	25.00	6.3	-5.4	6.2	-13.2	6.6	-4.3
	3.13	11.7	10.6	9.1	-7.8	12.2	9.3
竹节参皂苷 IVa	200.00	12.0	-2.5	8.6	-4.5	11.8	1.5
	25.00	8.1	-2.6	7.1	-8.1	5.6	1.2
	3.13	11.8	0.7	13.9	-3.5	11.1	2.6
救必应酸	2 000.00	6.4	-14.3	6.1	-6.9	6.1	-14.7
	125.00	6.3	-4.7	10.0	-7.1	9.0	-7.1
	7.81	14.4	-11.7	7.5	-7.5	12.7	-11.6
rotundanonic acid	200.00	8.2	-11.1	8.2	-9.5	4.9	-12.2
	25.00	8.3	-1.4	8.4	-9.5	12.5	1.3
	3.13	10.6	0.7	13.7	-1.3	14.2	1.1
冬青素 A	200.00	8.3	-4.2	5.1	-13.4	7.2	-12.6
	25.00	5.0	14.0	7.6	-4.5	10.5	4.3
	3.13	5.7	8.2	9.7	-8.2	10.9	-7.6

3.2.5 基质效应和提取回收率试验 如表 3 所示, 该方法符合生物样品分析时对提取回收率和基质效应的要求, 11 个成分的提取回收率为 86.0%~105.1%, 相对偏差小于 14.7%; 基质效应为 85.7%~110.5%, 相对偏差小于 14.2%。

3.3 血药浓度-时间曲线和主要药动学参数

测定 11 个成分在正常和模型组大鼠给药后各时间点的血药浓度, 将所得数据导入 DAS 2.0 软件以非房室模型和统计矩方法拟合药动学参数。主要药动学参数见表 5, 血药浓度-时间曲线见图 4。

表 5 11 个成分的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 5 Main pharmacokinetic parameters of 11 analytes ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

成分	组别	$C_{max}/(nmol \cdot L^{-1})$	t_{max}/h	$t_{1/2}/h$	$AUC_{0 \sim t}/(nmol \cdot h \cdot L^{-1})$	$AUC_{0 \sim \infty}/(nmol \cdot h \cdot L^{-1})$	$MRT_{0 \sim t}/h$
冬青苷 O	正常	34.4±10.7	3.1±1.1	13.3±8.7	389.0±117.8	459.2±107.5	13.2±3.2
	模型	33.4±8.6	3.4±1.1	12.2±6.1	407.8±188.4	455.9±219.3	13.1±4.2
oblonganoside I	正常	48.2±9.7	2.4±1.1	15.1±5.5	606.2±140.6	740.9±176.1	14.5±3.6
	模型	40.6±12.0	2.7±1.6	11.5±2.9	379.6±113.9**	453.9±91.3**	11.8±2.7
rotundinoside C	正常	37.1±6.6	3.1±1.6	23.5±18.8	399.6±145.8	503.3±118.3	12.8±2.4
	模型	37.4±4.5	3.7±1.4	17.8±13.8	516.0±147.5	610.0±210.4	14.4±4.4
ilexside II	正常	34.1±5.7	2.8±1.1	39.2±65.3	324.3±60.7	387.3±73.3	12.3±2.7
	模型	21.3±3.7**	2.5±1.0	20.3±9.0	309.4±90.0	355.7±91.7	16.0±4.3
长梗冬青苷	正常	361.8±96.8	1.5±0.4	15.4±6.9	3 159.1±778.8	3 758.1±747.1	13.7±3.6
	模型	223.2±42.5**	2.8±1.3*	17.6±7.0	2 051.3±751.6*	2 297.1±806.5**	13.3±2.8
苦丁冬青苷 H	正常	75.8±7.3	2.6±1.8	8.8±3.5	857.2±175.9	911.0±217.8	11.7±1.6
	模型	52.7±10.9**	2.9±1.3	17.4±7.7*	469.7±191.4*	563.2±190.7*	16.8±17.4
毛冬青皂苷 A ₁	正常	56.8±11.7	2.0±1.0	12.4±4.8	435.8±122.5	510.3±136.0	10.5±2.4
	模型	30.6±9.9**	2.7±1.7	23.9±20.0	310.1±90.1*	465.3±188.1	13.1±5.9
竹节参皂苷 IVa	正常	66.4±13.3	1.9±1.0	15.5±8.4	718.1±316.6	828.3±334.5	12.3±3.7
	模型	82.8±15.4	2.1±0.9	10.3±6.9	676.5±137.9	728.2±164.5	10.0±1.8
救必应酸	正常	3 257.9±315.6	1.1±0.3	11.2±10.1	29 897.6±8 815.6	38 641.3±22 798.0	8.8±1.1
	模型	2 173.8±452.7**	1.7±1.3	12.9±3.8	24 501.3±6 453.8*	28 070.9±8 938.7	14.5±1.9**
rotundanonic acid	正常	85.2±16.3	1.1±0.4	20.1±16.0	1 068.9±365.9	1 263.6±401.7	16.6±2.7
	模型	37.7±13.3**	1.2±0.3	41.3±46.0	594.4±254.1*	937.7±294.7	18.9±3.1
冬青素 A	正常	152.4±55.2	0.8±0.4	23.2±20.9	1 413.6±551.7	2 266.6±1 165.8	13.7±5.2
	模型	109.8±46.6	1.8±0.3*	47.3±46.6	787.4±97.7*	1 421.2±617.5	14.9±4.7

与正常组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

4 讨论

4.1 优化样品制备及分析方法

本研究考察了固相萃取、甲醇沉淀蛋白、乙腈沉淀蛋白法处理血浆样品时对 11 个成分选择性、基质效应和提取回收率的影响, 结果表明固相萃取法的选择性和降低基质效应的效果最好, 但是提取回收率低于甲醇或乙腈沉淀蛋白法。考虑到固相萃取法操作较为繁琐和费时, 且样品数量较多, 因此首先排除固相萃取法。甲醇或乙腈沉淀蛋白法虽然基质效应高于固相萃取法, 但是其重复性和提取回收率相对较好, 且处理后样品中的内源性物质未对 11 个成分和内标的测定造成干扰, 满足药动学研究的要求。考虑到乙腈的毒性和成本, 最终选择甲醇沉淀蛋白法作为本研究血浆样品处理方法。

本研究考察了不同流动相(乙腈-水、甲醇-水、0.1%甲酸乙腈溶液-0.1%甲酸水溶液、0.1%甲酸甲

醇溶液-0.1%甲酸水溶液)、不同色谱柱(Waters UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)以及 Waters UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、不同体积流量(0.3、0.4 mL/min)对 11 个成分和内标分离度与响应的影响, 结果表明当选用 0.1%甲酸乙腈-0.1%甲酸水溶液、Waters UPLC BEH C₁₈ 色谱柱、体积流量为 0.4 mL/min 时各成分的分离度和响应最好, 特别是同分异构体 **1** 和 **3** 能够在较短的时间内达到基线分离。本研究采用选择反应监测扫描模式, 并采用针泵进样对照品溶液优化了相应的质谱条件。11 个成分均为三萜, 且部分结构中含有 1~3 个糖分子, 根据相关文献^[11]报道选择地高辛作为内标。

4.2 药动学行为分析

本研究中的总三萜给药剂量是根据《中国药典》2015 年版救必应饮片成人用药剂量换算所得, 11

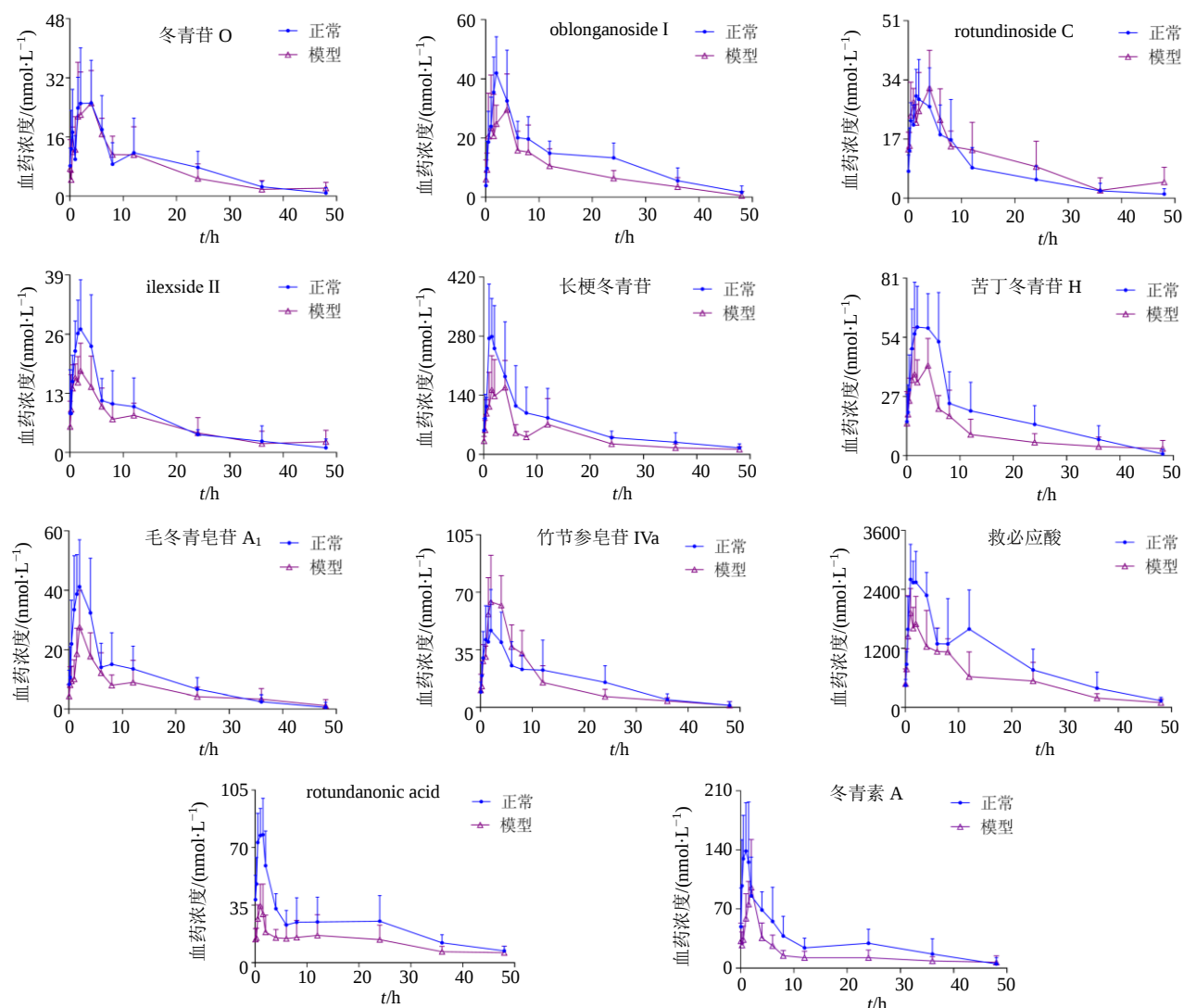


图 4 11 个成分在正常和模型组中的平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 4 Mean plasma concentration-time curves of 11 analytes in normal and model groups ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

个三萜成分在正常和模型组大鼠大部分时间点的血浆样品中均能够检测到。11 个成分根据结构中含糖的数目可以分为 5 类：苷元（9~11）、单糖苷（5、7）、双糖苷（2、6、8）、三糖苷（4）、四糖苷（1、3）。如图 4 所示，部分成分的血药浓度-时间曲线呈现了明显的双峰现象，推测可能是由于肝肠循环、小肠吸收时的不均匀性或给药剂量偏大等因素引起的^[12]。正常组大鼠单次 ig 救必应总三萜后苷元的达峰时间（ $t_{\max}$ ）为 0.8~1.1 h，单糖苷的 $t_{\max}$ 为 1.5~2.0 h、双糖苷的 $t_{\max}$ 为 1.9~2.6 h、三糖苷的 $t_{\max}$ 为 2.8 h、四糖苷的 $t_{\max}$ 为 3.1 h，提示在正常情况下苷元通过小肠吸收入血的速度明显快于皂苷，且皂苷含糖的数目越多吸收的速度越慢，与本课题组前期报道的正常大鼠单次 ig 救必应提取物（2.0 g/kg）后测定的 6 个特征性成分（1、3、5、9~11）的 $t_{\max}$

结果和规律基本一致^[10]。正常组中 11 个成分的达峰浓度（ $C_{\max}$ ）和药时曲线下面积（ $AUC_{0 \sim t}$ ）与其在总三萜中的含量和化学结构相关，化合物 1~4、6~8、10、11 的 $C_{\max}$ 和 $AUC_{0 \sim t}$ 分别为 34.1~152.4 nmol/L、324.3~1 413.6 nmol·h/L，化合物 5（长梗冬青苷）的 $C_{\max}$ 和 $AUC_{0 \sim t}$ 分别为 361.8 nmol/L 和 3 159.1 nmol·h/L，化合物 9（救必应酸）的 $C_{\max}$ 和 $AUC_{0 \sim t}$ 分别为 3 257.9 nmol/L 和 29 897.6 nmol·h/L。长梗冬青苷和救必应酸在总三萜中的质量分数分别为 22%、18%，差别不大，但救必应酸的 $C_{\max}$ 和 $AUC_{0 \sim t}$ 分别是长梗冬青苷的 9.0、9.5 倍。前期研究^[10]也得出了类似的结论，可能是因为救必应酸作为苷元更容易吸收入血，长梗冬青苷等以救必应酸为苷元的救必应三萜类成分能够在肠道菌群的作用下代谢转化为救必应酸^[13-14]，在一定程度上增加了

救必应酸的给药浓度。

11 个成分在高脂血症大鼠中的主要药动学参数的变化规律同正常组基本一致。苷元的入血吸收速度显著快于皂苷，救必应酸为 ig 总三萜后血浆中的主要暴露成分，且救必应酸的 $C_{\max}$ 和 $AUC_{0\sim t}$ 远超其他 10 个成分的总和。与正常组相似，虽然总三萜中救必应酸和长梗冬青苷的含量相差不大，但模型组中救必应酸的 $C_{\max}$ 和 $AUC_{0\sim t}$ 分别是长梗冬青苷的 9.7、11.9 倍。与正常组相比，除化合物 4 外，模型组其他 10 个成分的 $t_{\max}$ 均不同程度地延后；除化合物 3 和 8 外，模型组其他 9 个成分的 $C_{\max}$ 均不同程度地降低，化合物 4~7、9 和 10 有统计学差异；除化合物 1 和 3 外，模型组其他 9 个成分的 $AUC_{0\sim t}$ 均不同程度地降低，化合物 2、5~7、9~11 有统计学差异。本课题组前期研究表明肠道菌群有助于救必应三萜类成分吸收入血^[13]，高脂血症大鼠的肠道菌群处于失衡状态，菌群结构和相关酶的活力较正常状态存在较大改变，因此疾病状态对救必应三萜类成分的吸收入血速率和程度可能存在较大的影响。另外，与正常大鼠相比，高脂血症大鼠的脂肪肝病样病变可能影响药物的代谢和排泄，肠道中胆汁酸的分泌增加可能干扰药物的吸收，以上因素可能最终导致部分三萜类成分的 $t_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 不同程度地延长或降低。

综上，救必应总三萜主要成分在正常和高脂血症大鼠体内的药动学行为存在显著差异，苷元入血吸收的速度明显快于皂苷，且含糖的数目越多吸收入血的速度越慢。救必应酸为 ig 总三萜后血浆中的主要暴露成分， $C_{\max}$ 和 $AUC_{0\sim t}$ 远超其他 10 个成分的总和，推测救必应酸可能是救必应总三萜发挥心脑血管活性的关键成分。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yang B, Xuan S X, Ruan Q F, et al. UPLC/Q-TOF-MS/MS-based metabolomics revealed the lipid-lowering effect of *Ilicis Rotundae Cortex* on high-fat diet induced hyperlipidemia rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 256: 112784.
- [2] Liu C, Shen Y J, Tu Q B, et al. Pedunculoside, a novel triterpene saponin extracted from *Ilex rotunda*, ameliorates high-fat diet induced hyperlipidemia in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 101: 608-616.
- [3] Hsu Y M, Hung Y C, Hu L H, et al. Anti-diabetic effects of madecassic acid and rotundic acid [J]. *Nutrients*, 2015, 7(12): 10065-10075.
- [4] 李川. 中药多成分药代动力学研究: 思路与方法 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(4): 607-617.
- [5] 艾进超, 何昱, 杨荣兵, 等. 丹红注射液中主要有效成分在脑缺血大鼠体内药动学研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(20): 3039-3044.
- [6] 孟莹, 逯双, 陈明月, 等. 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 [J]. *中草药*, 2018, 49(6): 1345-1350.
- [7] Zhao W O, Pang L, Xu D H, et al. LC-MS/MS determination and pharmacokinetic study of pedunculoside in rat plasma after oral administration of pedunculoside and *Ilex rotunda* extract [J]. *Molecules*, 2015, 20(5): 9084-9098.
- [8] 赵文珠, 居文政, 臧雨馨, 等. 具栖冬青苷在大鼠体内的药动学 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2016, 35(1): 46-49.
- [9] 南敏伦, 赫玉芳, 赵昱玮, 等. 救必应酸在大鼠体内的口服生物利用度研究 [J]. *中国药师*, 2016, 19(9): 1648-1650.
- [10] Yang B, Li H, Ruan Q F, et al. Rapid profiling and pharmacokinetic studies of multiple potential bioactive triterpenoids in rat plasma using UPLC/Q-TOF-MS/MS after oral administration of *Ilicis Rotundae Cortex* extract [J]. *Fitoterapia*, 2018, 129: 210-219.
- [11] Zhou L, Xing R, Xie L, et al. Development and validation of an UFLC-MS/MS assay for the absolute quantitation of nine notoginsenosides in rat plasma: Application to the pharmacokinetic study of *Panax notoginseng* extract [J]. *J Chromatogr B*, 2015, 995/996: 46-53.
- [12] Zhang D D, Lei T L, Lv C, et al. Pharmacokinetic studies of active triterpenoid saponins and the total secondary saponin from *Anemone raddeana* Regel [J]. *J Chromatogr B*, 2017, 1044/1045: 54-62.
- [13] Yang B, Li H, Ruan Q F, et al. Effects of gut microbiota and ingredient-ingredient interaction on the pharmacokinetic properties of rotundic acid and pedunculoside [J]. *Planta Med*, 2019, 85(9/10): 729-737.
- [14] 曹迪, 范真, 朱锦萍, 等. 大鼠肠道菌群对长梗冬青苷体外代谢的影响 [J]. *中国药师*, 2016, 19(4): 621-624.

[责任编辑 李亚楠]