

基于阿尔茨海默症模型大鼠的开心散药动学研究

冯晓晓, 王彬斌, 陈东, 仇峰, 龚慕辛, 李朝霞*

首都医科大学中医药学院 中医络病研究北京市重点实验室, 北京 100069

摘要:目的 表征开心散各成分在寡聚态 β 淀粉样蛋白1-42(β amyloid protein 1-42, $A\beta_{1-42}$)诱导阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)模型大鼠体内的药动学行为, 建立并验证同时测定大鼠血浆中开心散各成分含量的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)方法。方法 采用双侧海马注射寡聚态 $A\beta_{1-42}$ 的方法建立AD大鼠模型, 开心散单次ig给药, 于不同时间点取血, 测定各成分的血药浓度。采用DAS 2.0软件以非房室模型拟合, 计算药动学参数。结果 建立的UPLC-MS/MS方法的精密性、准确性、提取回收率、基质效应和稳定性等方法学考察结果均符合生物样品分析的测定要求。Morris水迷宫实验证实成功构建AD大鼠模型($P < 0.05$)。AD模型大鼠给予开心散后, 按中药化学结构分类的同型化合物具有相似的药动学特征, 如属于同分异构体的 α -细辛醚和 β -细辛醚、同属于羊毛甾-7,9(11)-二烯型三萜的去氢土莫酸与松苓新酸以及同属于3,4-开环-羊毛甾-7,9(11)-二烯型三萜的茯苓新酸A和茯苓新酸B等。 α -细辛醚和 β -细辛醚的达峰时间(t_{max})和消除半衰期($t_{1/2}$)均较短, 表明二者在AD模型大鼠体内吸收迅速, 消除也快; 茯苓新酸A和茯苓新酸B的达峰时间(t_{max})较短, 但二者的半衰期($t_{1/2}$)却较长, 表明它们吸收迅速, 但消除缓慢。去氢土莫酸和松苓新酸达峰时间(t_{max})和半衰期($t_{1/2}$)均较长, 吸收和消除缓慢。此外, 去氢土莫酸的药时曲线存在双峰现象, 其平均滞留时间(MRT)也较长, 这可能源于较强的肝肠循环, 延长了其作用时间。结论 揭示了AD疾病状态下开心散的体内药动学过程, 为阐明开心散成分体内过程及其后续研究开发提供参考。

关键词: 开心散; 阿尔茨海默症; 药动学; 超高效液相色谱-串联质谱; 寡聚态 β 淀粉样蛋白1-42; α -细辛醚; β -细辛醚; 茯苓新酸A; 茯苓新酸B; 去氢土莫酸; 松苓新酸

中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)14-4388-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.14.018

Pharmacokinetic study of Kaixin Powder in rats with Alzheimer's disease

FENG Xiao-xiao, WANG Bin-bin, CHEN Dong, QIU Feng, GONG Mu-xin, LI Zhao-xia

Beijing Key Laboratory of TCM Collateral Disease Theory Research, School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract: Objective To characterize the pharmacokinetic behavior of the analytes of Kaixin Powder (开心散) in Alzheimer's disease (AD) rats induced by oligomeric β amyloid protein 1-42 ($A\beta_{1-42}$), and establish and verify an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for simultaneous determination of components of Kaixin Powder in rat plasma. **Methods** Rats model of AD was established by bilateral hippocampal injection of oligomeric $A\beta_{1-42}$. Kaixin Powder was administered by single ig, blood was collected at different time points, and plasma concentrations of ingredients were determined. DAS 2.0 software was used to fit non-compartmental models to calculate pharmacokinetic parameters. **Results** The established UPLC-MS/MS method in terms of precision, accuracy, extraction recovery, matrix effect and stability and other methodological investigation results all met the determination requirements of biological sample analysis. The results of Morris water maze test confirmed that AD rats model was successfully constructed ($P < 0.05$). After administration of Kaixin Powder, pharmacokinetic parameters of analytes with similar structure were similar, such as α -asarone and β -asarone belonging to isomers, dehydrotumulosic acid and dehydrotrametenolic acid belonging to lanosta-7,9(11)-diene type triterpenes, poricoic acid A and poricoic acid B belonging to 3,4-seco-lanostan-7,9(11)- diene type triterpenes. t_{max} and $t_{1/2}$ of α -asarone and β -asarone were short which showed a rapid absorption and elimination. t_{max} of poricoic acid A and poricoic acid B were short but $t_{1/2}$ of them were long, suggesting a rapid absorption and

收稿日期: 2022-03-07

基金项目: 北京市自然科学基金面上项目(7182019); 北京市青年拔尖人才培养计划项目(CIT&TCD201504098)

作者简介: 冯晓晓, 硕士研究生, 研究方向为中药体内过程和作用机制研究。E-mail: ccmufxx@163.com

*通信作者: 李朝霞, 副教授, 研究方向为中药体内过程和作用机制研究。E-mail: gmacli@ccmu.edu.cn

slow elimination; t_{\max} and $t_{1/2}$ of dehydrotumulosic acid and dehydrotrametenolic acid were long, so the absorption and elimination rates of these compounds were slow. Moreover, dehydrotumulosic acid played a double-peak phenomenon and MRT of it was long. This might be caused by the enterohepatic circulation, and time of dehydrotumulosic acid *in vivo* could be prolonged. **Conclusion** The *in vivo* pharmacokinetic process of the analytes of Kaixin Powder in AD rats is revealed, which can provide reference for clarifying the *in vivo* process of Kaixin Powder and its subsequent research and development.

Key words: Kaixin Powder; Alzheimer's disease; pharmacokinetics; UPLC-MS/MS; oligomeric A β_{1-42} ; α -asarone; β -asarone; poricoic acid A; poricoic acid B; dehydrotumulosic acid; dehydrotrametenolic acid

开心散源自唐代孙思邈所著的《备急千金要方》^[1], 由人参、远志、石菖蒲、茯苓 4 味药组成, “主好忘”, 历代医家记载开心散对健忘、怔忡等病症具有良好的治疗作用^[2-4]。较多现代研究证实开心散在治疗阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 方面具有良好的应用前景^[5-9], 然而其体内过程、起效机制与临床合理应用尚不明确, 有待深入研究。

药动学研究可揭示中药复方中有效成分的动态变化规律, 为阐明复方的药效物质基础与作用机制提供依据^[10]。目前开心散及其类方的药动学研究主要聚焦于源自人参和远志中的部分化学成分, 如人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、远志呋酮 III、西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6 等^[11-18], 但对方中源自石菖蒲与茯苓的成分涉及较少。究其原因, 可能是因为石菖蒲与茯苓成分在药材中含量较低, 且生物利用度不高, 检测难度大。本课题组在前期研究中选用临床应用较多的经典开心散组方^[19-23], 证实其能够有效改善 AD 模型动物 APP/PS1 转基因小鼠的学习记忆能力。鉴于此方重用石菖蒲和茯苓 (人参、远志、石菖蒲、茯苓为 1:1:25:50), 因此有必要在开展药动学研究时重视源自石菖蒲和茯苓 2 味药中的成分, 以期全面表征开心散的药动学特征。

此外, AD 疾病状态可能会导致开心散的体内过程发生改变, 影响临床精准用药, 故以 AD 模型动物为研究对象开展药动学研究可更好地阐明开心散各成分的体内过程^[24]。因此, 本研究选用双侧海马 CA1 区立体定位注射寡聚态 β 淀粉样蛋白 1-42 (β amyloid protein 1-42, A β_{1-42}) 建立 AD 模型大鼠, 建立并验证超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 方法测定开心散中待测成分的血药浓度, 对开心散的体内过程进行研究, 以期为开心散的临床研究和应用提供参考。

1 材料

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠, 体质量 (250±20) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证

号 SYXK (京) 2016-0006。动物饲养于温度 (25±2) °C、湿度 (50±10) % 的屏障环境内, 给予标准颗粒饲养并自由饮水, 每日光照 12 h。实验前, 适应性饲养 7 d。伦理审查由首都医科大学伦理委员会批准, 伦理编号 AEEI-2018-101, 所有动物实验均在中华人民共和国科技部颁布的实验动物护理和使用的指导下进行。

1.2 药材

开心散由人参、远志、石菖蒲和茯苓组成。人参 (批号 16110803)、石菖蒲 (批号 17110103) 和茯苓 (批号 17111504) 购自北京能济中药饮片有限公司, 远志 (批号 16080803) 购自北京明辉恒通药业有限公司, 经首都医科大学中医药学院李佳副教授鉴定分别为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎、天南星科植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott. 的干燥根茎、多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核和远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 的干燥根, 均符合《中国药典》规定。

1.3 试剂

开心散待测成分的化学结构见图 1。对照品 α -细辛醚 (批号 PS001187, 质量分数 >98%)、去氢土莫酸 (批号 PS011211, 质量分数 >98%)、茯苓新酸 A (批号 PS010102, 质量分数 >97%)、盐酸丁螺环酮 (批号 6-EOD-111-1, 质量分数 >98%) 和斯皮诺素 (批号 PS000864, 质量分数 >98%) 购自成都普思生物科技股份有限公司; β -细辛醚对照品 (批号 11208-201601, 质量分数为 96.8%) 购自中国食品药品检定研究院; 对照品松苓新酸 (批号 Y08J7H8750, 质量分数 >98%)、茯苓新酸 B (批号 P13J9L63651, 质量分数 >95%) 购自上海源叶生物科技有限公司; 色谱纯甲醇、色谱纯甲酸购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 娃哈哈纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司; A β_{1-42} 购自 MCE 公司。

1.4 仪器

QTRAP6500 型 UPLC-QQQ-MS/MS (美国 AB

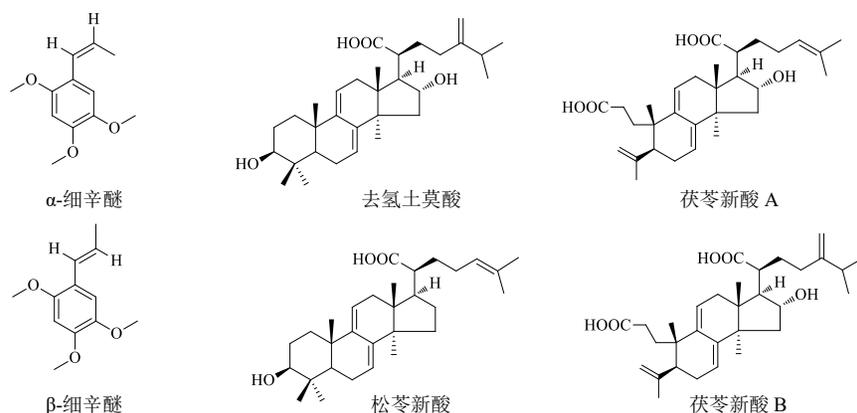


图1 开心散中待测成分的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of analytes in Kaixin Powder

Sciex 公司); DV215CD 型十万分之一电子天平 (德国 Sartorius 公司); V0400 型真空干燥箱 (德国 Memmert 公司); 3K15 型低温高速离心机 (美国 Sigma 公司); MG-2200 型氮吹仪 (日本 EYELA 公司); ZH-2 型涡旋混合器 (天津药典标准仪器厂); KQ-250 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 超低温冰箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 68025 型脑立体定位仪 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司); 788130 型显微注射泵 (美国 KDS 公司); 78001 型颅钻 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司); 63031 型水迷宫实验设备 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司)。

2 方法

2.1 开心散的制备

将 4 味药材粉碎, 过 24 目筛得到中药粗粉。按比例称取药材粉末, 加入 12 倍量 70%乙醇, 浸泡 0.5 h, 回流提取 2 h, 滤过, 滤渣用 10 倍量 70%乙醇, 回流提取 1 h, 滤过, 合并滤液, 减压回收乙醇, 干燥, 得开心散提取物。经检测, 每克开心散复方中含 β -细辛醚 1194 μg 、 α -细辛醚 125.0 μg 、去氢土莫酸 193.2 μg 、茯苓新酸 A 9.326 μg 、茯苓新酸 B 10.93 μg 、松苓新酸 12.23 μg ^[23]。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取 α -细辛醚、 β -细辛醚、去氢土莫酸、松苓新酸、茯苓新酸 A 和茯苓新酸 B 对照品适量, 以甲醇溶解, 分别配制成质量浓度为 1.00 mg/mL 的单一对照品溶液。精密吸取上述单一对照品溶液, 以甲醇稀释, 配制为系列混合对照品溶液, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

精密称取丁螺环酮和斯皮诺素对照品适量, 以甲醇溶解, 分别配制成质量浓度为 1.00 mg/mL 的单

一对照品溶液。精密吸取上述对照品溶液, 用甲醇-乙腈溶液 (1:1) 稀释, 得到内标溶液 (含丁螺环酮 10 ng/mL、斯皮诺素 500 ng/mL), 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.3 色谱条件和质谱条件

2.3.1 色谱条件 安捷伦 1290 Infinity 型超高效液相色谱仪, 配有 G4220A 泵、G1316C 柱温箱、G4226A 进样器、G1330B 恒温器。色谱柱为 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 2.7 μm)。流动相为 0.1%甲酸水溶液 (A)-含 0.1%甲酸的甲醇溶液 (B), 梯度洗脱: 0~1.0 min, 35% B; 1.0~3.0 min, 35%~70% B; 3.0~5.5 min, 70%~73% B; 5.5~5.6 min, 73%~90% B; 5.6~7.0 min, 90% B; 7.0~7.1 min, 90%~100% B; 7.1~9.0 min, 100% B; 9.0~9.1 min, 100%~35% B; 9.1~10.0 min, 35% B。柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 体积流量 0.3 mL/min; 进样体积 2.0 μL 。

2.3.2 质谱条件 AB SCIEX API 4000™三重四级杆质谱仪, 离子源为电喷雾离子源 (ESI), 采用多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式, 在正负离子模式下同时检测, 质谱参数如下: 不同离子模式下气帘气 137.90 kPa; 毛细管温度 $500\text{ }^{\circ}\text{C}$; 入口电压 $\pm 10\text{ V}$; 离子喷雾电压 $\pm 4500\text{ V}$; 雾化器气体 344.75 kPa, 加热器气体 344.75 kPa; 碰撞池出口电压正离子模式 82.74 kPa, 负离子模式 -13.0 V 。开心散待测成分与内标的质谱参数见表 1。

2.4 血浆样品的处理

取血浆样品, 在室温下解冻, 涡旋 30 s, 精密吸取血浆样品 50 μL , 加入 10 μL 甲醇溶液、150 μL 含 2 种内标的甲醇-乙腈溶液 (1:1), 涡旋 30 s。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液定量转移

表1 开心散待测成分及内标的质谱参数

Table 1 Mass spectrum conditions of analytes of Kaixin Powder and internal standard

化合物	ESI 模式	母离子(m/z)	子离子(m/z)	去簇电压/V	碰撞能量/eV
α -细辛醚	+	209.2	194.1	80	21.0
β -细辛醚	+	209.1	194.1	80	21.0
盐酸丁螺环酮	+	386.0	122.0	145	37.2
去氢土莫酸	-	483.5	483.5	-220	-45.8
松苓新酸	-	453.3	453.3	-220	-46.7
茯苓新酸 A	-	497.5	423.2	-190	-40.8
茯苓新酸 B	-	483.4	465.1	-200	-33.5
斯皮诺素	-	607.3	427.3	-200	-41.3

至离心管, 氮气流下蒸干。残渣加 50 μ L 甲醇复溶, 涡旋混匀 30 s, 超声处理 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进样分析。

2.5 方法学验证

根据《中国药典》2020 年版四部中的生物样品定量分析方法验证指导原则对本研究建立的定量分析方法进行系统验证。

2.5.1 选择性 比较空白血浆、空白血浆中加入定量下限 (low limits of quantification, LLOQ) 对照品和内标溶液以及大鼠开心散 30 min 后的血浆样品的 MRM 质谱图, 考察方法的选择性。

2.5.2 线性及 LLOQ 分别取大鼠空白血浆 50 μ L, 加入 10 μ L 系列质量浓度的混合对照品溶液, 按样品测定方法处理测定。混合对照品溶液配制如下: 分别定量吸取 α -细辛醚、 β -细辛醚、去氢土莫酸、松苓新酸、茯苓新酸 A 和茯苓新酸 B 母液, 加入定量甲醇, 配制成混合对照品溶液, 吸取一定量的混合对照品溶液, 用甲醇稀释成系列混合对照品溶液。 α -细辛醚、去氢土莫酸、茯苓新酸 A 和茯苓新酸 B 的标准曲线质量浓度均为 500、200、100、50.0、25.0、10.0、5.00、2.00 ng/mL; β -细辛醚的标准曲线质量浓度为 1000、500、200、100、50.0、25.0、10.0、5.00、2.00、1.00 ng/mL; 松苓新酸的标准曲线质量浓度为 1000、500、200、100、50.0、25.0、10.0 ng/mL。以对照品质量浓度为横坐标 (x), 以对照品峰面积与内标峰面积比值为纵坐标 (y), 用加权最小二乘法进行线性回归, 建立待测成分对照品在大鼠空白血浆中的标准曲线, 确定待测成分 LLOQ。

2.5.3 精密度与准确度 取一个分析批的 LLOQ 及低、中、高 3 种质量浓度质控样品 (每个浓度 6 份样品), 并制备标准曲线同批测定, 计算各成分的日内精密度和准确度; 连续测定 3 个分析批 (3 d 内), 计算各成分的日间精密度和准确度。

2.5.4 稳定性 制备低、中、高质量浓度的质控样

品, 进行室温放置 24 h, -80 $^{\circ}$ C 保存 7 d, -80 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次实验, 测定 (各实验每个浓度 6 份样品)。

2.5.5 提取回收率 制备低、中、高质量浓度的质控样品, 每个浓度 6 份样品, 进样分析。取空白血浆, 除不加混合对照品溶液之外按样品处理, 氮吹后加入混合对照品溶液, 进样分析。将质控样品峰面积和氮吹后加入标准溶液的样品的峰面积相比, 计算各成分的提取回收率。

2.5.6 基质效应 取空白血浆, 除不加混合对照品溶液之外按样品处理, 氮吹后再加入混合对照品溶液, 制备含有基质的低、中、高质量浓度样品, 每个质量浓度 6 份样品。制备不含基质的样品 (待测成分和内标的纯溶液), 每个质量浓度 6 份样品。进样分析考察基质效应。

2.6 AD 模型大鼠的建立

2.6.1 寡聚态 $A\beta_{1-42}$ 的制备 取 $A\beta_{1-42}$ 粉末 1 mg, 加入二甲基亚砜和无菌生理盐水, 配制成质量浓度为 1 μ g/ μ L 的 $A\beta_{1-42}$ 溶液 (含 5% 二甲基亚砜)。37 $^{\circ}$ C 孵育 3 d, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.6.2 造模 雄性 SD 大鼠采用双侧海马 CA1 区立体定位注射寡聚态 $A\beta_{1-42}$ 造模^[25-28]。大鼠麻醉去毛备皮后固定在脑立体定位仪上, 消毒, 切开颅骨外皮肤, 去除骨膜。以前囟为原点, 在前囟后 -3.3 mm、左右 ± 2.2 mm、背腹侧 -2.8 mm 处, 使用微量注射器各注射 5 μ L $A\beta_{1-42}$ (1 μ g/ μ L), 注射速度为 1 μ L/min, 注射结束后留针 5 min。退针后缝合伤口, 伤口处用碘伏消毒, 并给予青霉素粉末抗菌。

2.6.3 Morris 水迷宫实验 手术 1 周后, 采用 Morris 水迷宫测试评价动物学习记忆能力。第 1 天起将平台置于某一象限, 进行定位航行实验, 记录逃逸潜伏期, 共实验 5 d, 定位航行实验结束 24 h 后, 进行空间探索实验, 记录动物在 120 s 内的穿越平台次数、目标象限时间比以及目标象限距离比。造模成功大鼠用于药动力学实验。

2.7 药动学研究

取上述经验证造模成功的 AD 模型大鼠 6 只，实验前禁食 12 h，可自由饮水。大鼠 ig 开心散 (10 g/kg)，分别于给药前和给药后 5、10、15、30 min 及 1、2、4、6、8、12、24 h 时间点，取静脉血 200 μ L 至含有肝素钠的离心管中，4 $^{\circ}$ C、3000 r/min 离心 10 min，分离血浆，于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

2.8 数据处理

在 Morris 水迷宫实验中，定位航行实验结果使用双因素重复测量方差分析。空间探索实验中穿越平台次数采用非参数检验分析，其他数据采用单因素方差分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

使用 DAS 2.0 软件以非房室模型计算成分的药

动学参数。使用 GraphPad Prism v6.0 软件绘制血药浓度-时间曲线。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 Morris 水迷宫评价 AD 模型大鼠

如图 2 所示，在定位航行实验的第 1、2、3 天，AD 模型大鼠的逃逸潜伏期较正常大鼠更长 ($P < 0.05$)，说明 AD 模型大鼠找到水下隐藏平台需要更长的时间；在空间探索实验中，AD 模型大鼠穿越平台的次数、目标象限时间比和目标象限距离比均明显低于正常大鼠 ($P < 0.05$)。综上，行为学实验结果表明 AD 模型大鼠模型建立成功。

3.2 方法学考察

3.2.1 选择性 如图 3 所示，各化合物峰形良好，

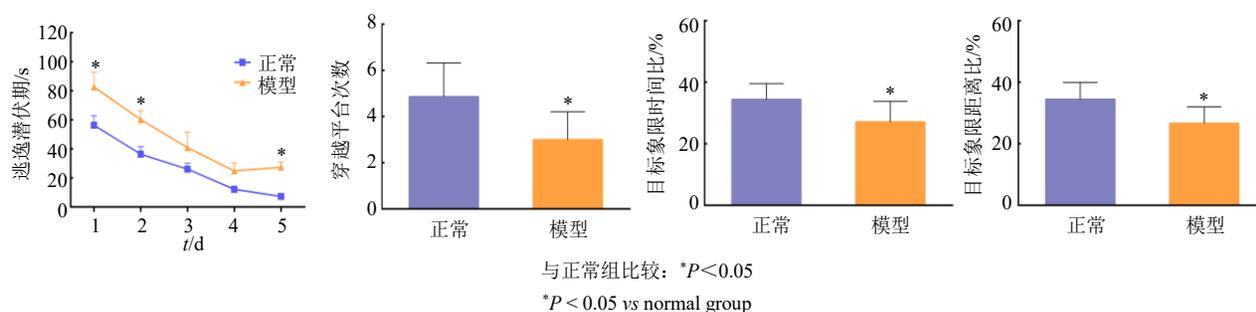


图 2 Morris 水迷宫实验结果

Fig. 2 Results of Morris water maze test

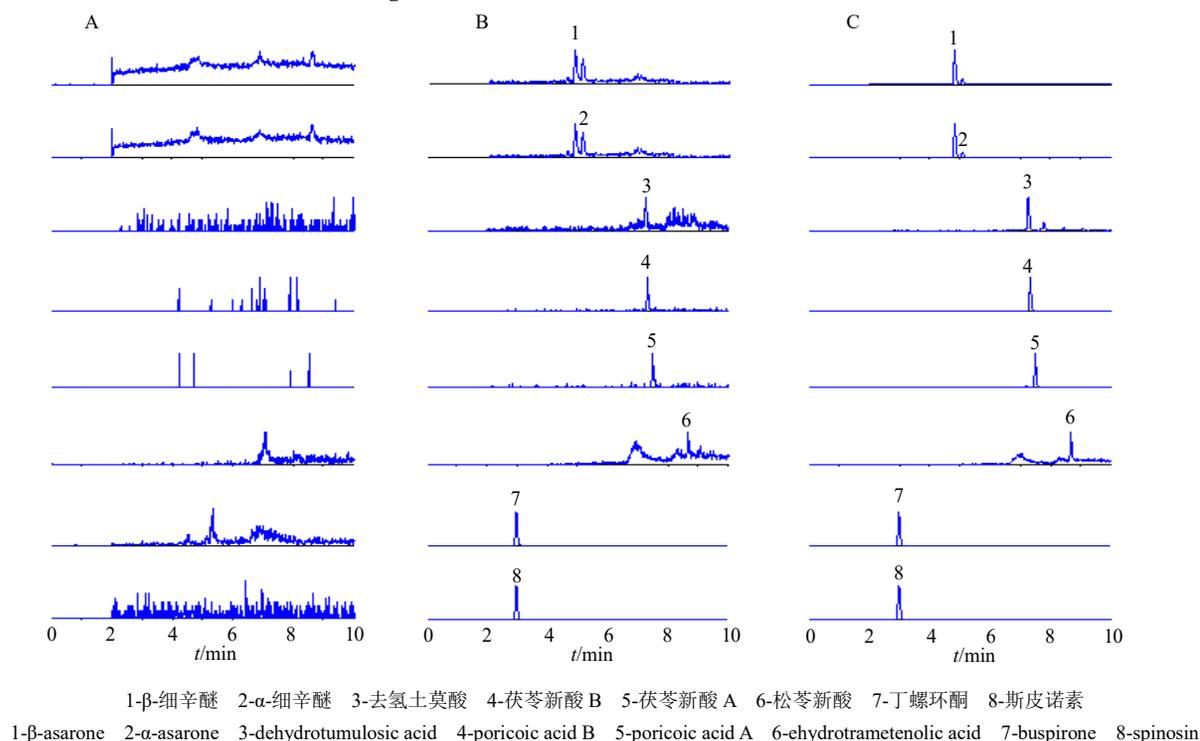


图 3 空白血浆 (A)、空白血浆加对照品 (B) 以及给药后血浆样本 (C) 中开心散待测成分的色谱图

Fig. 3 Representative MRM chromatograms of analytes of Kaixin Power in blank plasma (A), blank plasma plus reference substance (B) and plasma sample after administration (C)

大鼠血浆中的内源性物质、可能的代谢产物等对待测成分和内标的测定无干扰。

3.2.2 线性和 LLOQ 采用 UPLC-MS/MS 法测定 AD 模型大鼠血浆中开心散待测成分的 LLOQ 及标准曲线的线性回归方程, 如表 2 所示, 各成分在相应质量浓度范围内显示出良好的线性。

3.2.3 精密度和准确度 如表 3 所示, 各成分的日内精密度和日间精密度均在 ±15% 以内, 日内准确度和日间准确度均在 ±15% 以内, 符合要求。

3.2.4 稳定性 稳定性考察结果见表 4。室温放置 24 h, -80 °C 保存 7 d, -80 °C 反复冻融 3 次实验样

品测定结果符合要求。

3.2.5 提取回收率和基质效应 提取回收率和基质效应结果见表 5, 各成分提取回收率为 86.36%~97.47%, RSD 值为 1.45%~6.60%, 基质效应为 80.50%~100.23%, RSD 值为 0.95%~6.88%, 均符合要求。

3.3 药动力学实验结果

采用建立的 UPLC-MS/MS 方法, 检测 AD 模型大鼠给药开心散后待测成分在不同时间点的血药浓度, 绘制得到平均血药浓度-时间曲线, 见图 4。

采用 DAS 2.0 软件, 以非房室模型计算 AD 模型大

表 2 开心散待测成分的线性回归方程及 LLOQ

Table 2 Calibration curves and LLOQ of analytes of Kaixin Powder

化合物	线性方程	r	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	LLOQ/(ng·mL ⁻¹)
α-细辛醚	$y=8.383 \times 10^{-4}x+5.130 \times 10^{-4}$	0.998 3	2.0~500.0	2.0
β-细辛醚	$y=5.768 \times 10^{-4}x-2.469 \times 10^{-2}$	0.995 9	1.0~1 000.0	1.0
去氢土莫酸	$y=1.925 \times 10^{-4}x+2.563 \times 10^{-4}$	0.995 7	2.0~500.0	2.0
松苓新酸	$y=1.250 \times 10^{-5}x+4.300 \times 10^{-4}$	0.999 6	10.0~500.0	10.0
茯苓新酸 A	$y=9.476 \times 10^{-5}x-1.191 \times 10^{-4}$	0.997 1	2.0~500.0	2.0
茯苓新酸 B	$y=1.250 \times 10^{-5}x+1.410 \times 10^{-4}$	0.996 8	2.0~500.0	2.0

表 3 开心散待测成分的精密度和准确度 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Accuracy and precision of analytes of Kaixin Powder ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

化合物	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	日内			日间		
		实测值/(ng·mL ⁻¹)	准确度/%	精密度/%	实测值/(ng·mL ⁻¹)	准确度/%	精密度/%
α-细辛醚	2.0	2.11±0.08	105.58	3.85	2.06±0.02	103.09	1.17
	5.0	5.06±0.12	101.30	2.44	5.13±0.04	102.58	0.72
	50.0	52.10±2.60	104.20	4.99	52.25±1.96	104.50	3.75
	400.0	400.92±12.03	100.23	3.00	411.56±18.68	102.89	4.54
β-细辛醚	1.0	1.00±0.07	100.17	7.27	1.01±0.02	101.39	2.23
	2.0	1.94±0.14	96.92	7.12	1.99±0.06	99.92	3.18
	50.0	51.13±1.14	102.26	2.22	50.96±0.64	101.91	1.25
	800.0	775.60±26.14	96.95	3.37	771.92±28.02	96.49	3.63
去氢土莫酸	2.0	2.07±0.10	103.33	4.95	2.04±0.03	101.75	1.60
	5.0	5.03±0.08	100.63	1.50	5.03±0.03	100.58	0.55
	50.0	51.32±1.62	102.63	3.16	53.71±2.73	107.42	5.08
	400.0	389.56±6.58	97.39	1.69	389.68±12.47	97.42	3.20
松苓新酸	10.0	10.46±0.61	104.62	5.84	10.44±0.42	104.39	4.02
	20.0	20.47±0.73	102.34	3.57	20.44±0.08	102.21	0.39
	100.0	103.95±1.37	103.95	1.32	104.21±1.32	104.21	1.27
	400.0	407.16±7.25	101.79	1.78	398.52±7.69	99.63	1.93
茯苓新酸 A	2.0	2.06±0.08	103.25	4.07	2.09±0.04	104.53	1.72
	5.0	5.26±0.27	105.10	5.13	5.16±0.19	103.27	3.68
	50.0	51.42±1.90	102.84	3.70	54.22±2.67	108.44	4.93
	400.0	414.00±11.84	103.50	2.86	395.92±21.58	98.98	5.45
茯苓新酸 B	2.0	2.04±0.12	101.83	6.04	2.22±0.21	111.19	9.27
	5.0	5.06±0.16	101.20	3.22	5.14±0.10	102.72	1.98
	50.0	51.67±1.66	103.34	3.22	53.60±1.70	107.20	3.18
	400.0	396.72±10.90	99.18	2.77	385.00±16.79	96.25	4.36

表 4 开心散待测成分的稳定性 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Stability of analytes of Kaixin Powder ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

化合物	质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	室温放置 24 h			-80 °C冻存 7 d			反复冻融 3 次		
		实测值/ (ng·mL ⁻¹)	准确度/%	精密度/%	实测值/ (ng·mL ⁻¹)	准确度/%	精密度/%	实测值/ (ng·mL ⁻¹)	准确度/%	精密度/%
α-细辛醚	5.0	5.16±0.01	103.20	0.19	5.04±0.05	100.87	0.98	5.10±0.16	101.93	3.05
	50.0	51.92±0.89	103.83	1.71	50.44±2.07	100.87	4.10	49.48±2.27	98.96	4.58
	400.0	396.56±10.19	99.14	2.57	395.56±16.22	98.89	4.10	370.96±2.56	92.74	0.69
β-细辛醚	2.0	1.97±0.21	98.33	10.47	2.02±0.08	101.17	4.14	2.02±0.10	100.83	4.89
	50.0	51.22±1.15	102.43	2.24	51.15±1.87	102.31	3.66	51.80±1.32	103.61	2.55
	800.0	787.84±11.27	98.48	1.43	749.68±18.14	93.71	2.42	860.80±29.18	107.60	3.39
去氢土莫酸	5.0	5.06±0.04	101.27	0.75	5.04±0.05	100.87	1.02	5.01±0.13	100.13	2.53
	50.0	52.94±0.98	105.87	1.85	52.00±1.59	104.01	3.05	51.46±1.38	102.93	2.68
	400.0	405.76±4.75	101.44	1.17	382.00±9.36	95.50	2.45	402.04±12.10	100.51	3.01
松苓新酸	20.0	20.81±0.35	104.05	1.69	20.18±0.14	100.90	0.67	19.76±0.12	98.78	0.59
	100.0	105.66±2.74	105.66	2.59	105.30±3.34	105.30	3.17	99.79±2.94	99.79	2.95
	400.0	393.88±3.27	98.47	0.83	395.88±7.32	98.97	1.85	394.48±7.34	98.62	1.86
茯苓新酸 A	5.0	5.12±0.13	102.47	2.52	5.44±0.15	108.80	2.71	5.31±0.34	106.13	6.44
	50.0	50.10±2.24	100.20	4.94	52.74±1.92	105.49	3.64	51.14±3.97	102.28	7.77
	400.0	401.48±13.53	100.37	3.37	383.00±13.71	95.75	3.58	402.04±12.10	100.51	3.01
茯苓新酸 B	5.0	5.03±0.15	100.60	2.94	5.15±0.05	103.00	0.89	5.31±0.05	106.20	1.00
	50.0	53.02±1.74	106.03	3.29	49.22±0.36	98.45	0.73	51.36±3.10	102.73	6.03
	400.0	389.68±10.17	97.42	2.61	381.32±8.77	95.33	2.30	388.23±6.13	97.07	1.58

表 5 开心散待测成分的提取回收率和基质效应 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Recovery and matrix effect of analytes of Kaixin Powder ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

化合物	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	提取回收率/%	基质效应/%
α-细辛醚	5.0	95.07±3.08	93.39±6.35
	50.0	88.12±2.59	84.37±2.88
	400.0	86.72±3.10	80.50±1.27
β-细辛醚	2.0	90.81±2.14	98.01±6.88
	50.0	90.86±1.58	87.54±1.91
	800.0	89.46±2.35	84.87±2.11
去氢土莫酸	5.0	97.47±6.60	100.28±1.24
	50.0	94.31±3.39	96.95±2.57
	400.0	96.83±1.64	99.69±2.51
松苓新酸	20.0	87.50±2.56	90.41±2.48
	100.0	90.85±1.45	80.88±1.27
	400.0	97.08±2.56	92.69±0.95
茯苓新酸 A	5.0	86.50±3.14	91.54±4.17
	50.0	90.71±4.07	91.19±4.47
	400.0	95.95±5.62	96.65±2.20
茯苓新酸 B	5.0	86.36±2.11	92.16±6.08
	50.0	92.85±4.64	93.93±5.58
	400.0	96.29±4.74	98.00±3.99

鼠给药开心散后待测成分的药动学参数, 结果见表 6。结果显示, α-细辛醚的达峰时间 (t_{max}) 值与半衰期 ($t_{1/2}$) 值分别为 (0.26±0.12)、(0.54±0.25) h, β-细辛醚的 t_{max} 值与 $t_{1/2}$ 值分别为 (0.21±0.05)、

(0.65±0.24) h, 两者的达峰时间与半衰期均较短。去氢土莫酸的 t_{max} 值与 $t_{1/2}$ 值分别为 (3.92±4.11)、(3.57±1.04) h, 松苓新酸的 t_{max} 值与 $t_{1/2}$ 值分别为 (1.25±0.61)、(5.43±2.25) h, 两者的达峰时间与半衰期均较长。茯苓新酸 A 和茯苓新酸 B 的 t_{max} 值分别为 (0.28±0.11)、(0.24±0.03) h, 两者的 $t_{1/2}$ 值分别为 (3.90±1.67)、(7.99±2.88) h, 成分达峰时间较短但半衰期较长。

4 讨论

4.1 目标成分选择

基于复方配伍药味相关文献参考分析^[29-30], 本研究在初期选择开心散中人参皂苷类成分 (人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Re)、远志吡啶酮类成分 (远志吡啶酮 III)、寡糖酯类成分 (3,6'-二芥子酰基蔗糖)、细辛醚类成分 (α-细辛醚和 β-细辛醚)、茯苓三萜酸类成分 (去氢土莫酸、松苓新酸、茯苓新酸 A 和茯苓新酸 B) 作为药动学检测的目标成分, 但由于开心散中人参和远志的配伍比例比较低, 导致人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Re、3,6'-二芥子酰基蔗糖和远志吡啶酮 III 等在复方中的含量较低, 因此在血浆样品中其含量低于 LLOQ, 未能被准确定量。本研究最终以 α-细辛醚、β-细辛醚、去氢土莫酸、松苓新酸、茯苓新酸 A 和茯苓新酸 B 为检测成分进行开心散的药动学表征。

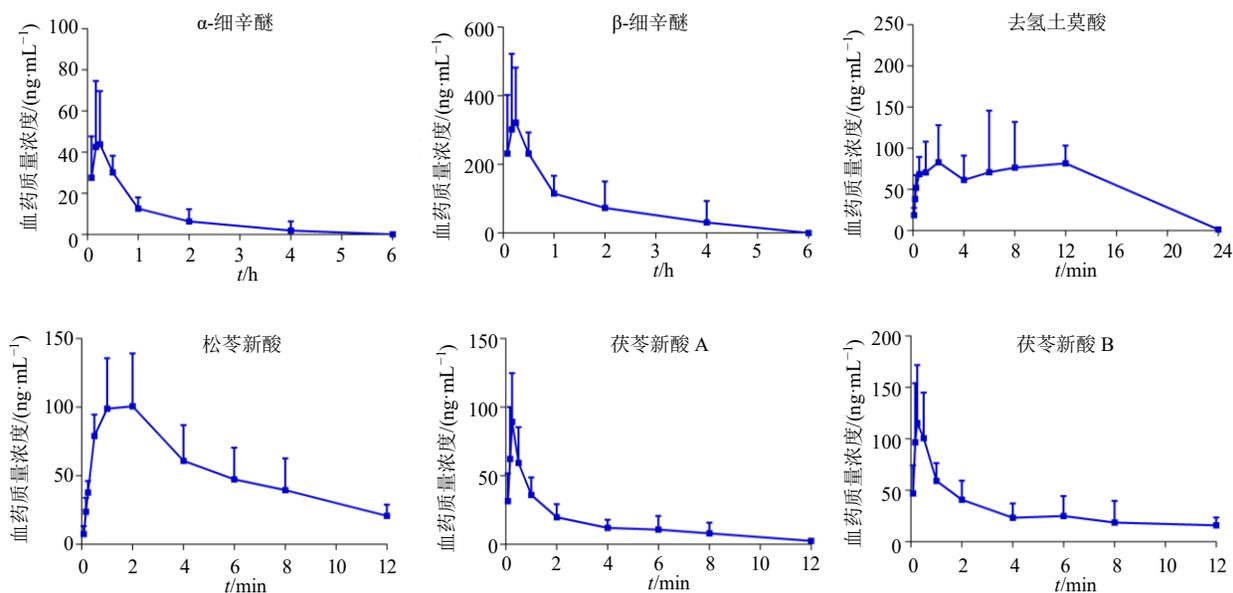


图4 AD模型大鼠 ig 开心散后待测成分的平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Mean plasma concentration-time curves of analytes in AD rats after ig Kaixin Powder ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表6 AD模型大鼠 ig 开心散后待测成分的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Pharmacokinetic parameters of analytes in AD rats after ig Kaixin Powder ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	α-细辛醚	β-细辛醚	去氢土莫酸	松苓新酸	茯苓新酸 A	茯苓新酸 B
t_{max}	h	0.26±0.12	0.21±0.05	3.92±4.41	1.25±0.61	0.28±0.11	0.24±0.03
C_{max}	ng·mL ⁻¹	35.88±5.81	269.00±45.30	120.38±53.68	114.88±37.19	91.56±36.28	117.30±54.65
AUC_{0-t}	ng·mL ⁻¹ ·h	38.52±13.01	329.20±106.13	1373.54±530.78	640.55±187.42	193.15±59.51	398.54±137.70
$AUC_{0-\infty}$	ng·mL ⁻¹ ·h	39.92±13.19	354.17±111.26	1381.30±530.43	795.20±208.57	213.27±49.45	498.05±210.28
$t_{1/2}$	h	0.54±0.25	0.65±0.24	3.57±1.04	5.43±2.25	3.90±1.67	7.99±2.88
MRT_{0-t}	h	0.91±0.58	0.77±0.30	8.53±1.01	4.49±0.78	3.19±0.86	5.18±0.49
$MRT_{0-\infty}$	h	0.99±0.57	0.97±0.37	8.67±1.04	7.88±2.49	4.14±1.01	10.92±6.04
CLz/F	L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	32.63±18.70	38.87±20.72	1.55±0.49	0.16±0.05	0.46±0.13	0.25±0.11
Vz/F	L·kg ⁻¹	21.73±7.05	35.00±15.91	8.43±4.65	1.35±0.91	3.26±2.21	2.21±1.63

4.2 检测条件优化与样品处理优化

通过比较正负离子模式下各成分的反应，本研究选择了响应更高的离子模式进行检测：α-细辛醚和β-细辛醚在正离子模式下检测；去氢土莫酸、松苓新酸、茯苓新酸 A 和茯苓新酸 B 在负离子模式下进行检测。不同检测离子模式下需要选用不同的内标成分，本研究选择盐酸丁螺环酮作为正离子模式下的内标成分，选择斯皮诺素作为负离子模式下的内标成分。

通过对比使用水-甲醇、水-乙腈作为流动相时各成分的反应，发现各成分在甲醇作为有机相时响应更高；在流动相中加入 0.1%甲酸水溶液后成分峰形有所优化，最终选定以 0.1%甲酸水溶液和 0.1%甲酸甲醇溶液为流动相。

处理血浆样品处理时，为保证蛋白沉淀完全，

本研究选择 50 μL 血浆中加入 150 μL 甲醇-乙腈混合溶液 (1:1) 进行样品处理。此外，由于血浆样品中成分含量较低，本研究取沉淀蛋白所得上清液定量，氮吹浓缩，残渣用 50 μL 甲醇复溶，离心取上清液进样测定。

4.3 AD 大鼠模型的建立与评价

AD 是一种以 β 淀粉样蛋白沉积形成的“老年斑”与 Tau 蛋白磷酸化形成的神经纤维缠结为主要特征的神经退行性疾病，其发病机制较为复杂，目前相关假说多样包括有 Aβ 沉积学说、胆碱能学说、Tau 蛋白假说、氧化应激学说、神经血管学说等^[31-33]，其中 Aβ 沉积学说占据主要地位。本课题组前期研究表明，开心散可在一定程度上改善 AD 模型动物 (APP/PS1 转基因小鼠) 的 Aβ 沉积，因此，本研究选择基于 Aβ 沉积相关的 AD 大鼠模型进行药

动力学研究。目前研究表明,采用 $A\beta_{1-42}$ 脑内定位注射方法建立的 AD 大鼠模型稳定,可重复且操作简便^[23,33]。因此,本研究选用该方法进行 AD 大鼠模型建立,并采用 AD 动物模型的经典评价指标 Morris 水迷宫实验^[31-32]进行 AD 大鼠模型的评价。

4.4 开心散各成分的药动学特征分析

α -细辛醚和 β -细辛醚互为同分异构体,化学结构相似,因而两者体内过程相似,多个药动学参数值相近,药动学参数表明 ig 开心散后 α -细辛醚和 β -细辛醚均迅速吸收进入体内并且消除较快,成分的体内变化趋势与文献报道相近^[34-35]。在本研究中,两者在达峰浓度 (C_{max}) 和曲线下面积 (AUC) 值的差异较大,推测其主要原因为复方中成分含量差异较大。文献报道^[34]大鼠 ig 石菖蒲挥发油提取物后 α -细辛醚和 β -细辛醚的 t_{max} 分别为 (1.42±0.18)、(1.58±0.18) h,而本研究中大鼠 ig 开心散后 α -细辛醚和 β -细辛醚的 t_{max} 分别为 (0.26±0.12)、(0.21±0.05) h,这提示开心散配伍可能促进 α -细辛醚和 β -细辛醚吸收。

去氢土莫酸与松苓新酸均为羊毛甾-7,9(11)-二烯型三萜,其药动学过程存在相似性,即呈现消除缓慢的现象。Zhang 等^[36]进行了茯苓醇提物的成分药动学研究,结果显示去氢土莫酸为单峰吸收,而本研究中去氢土莫酸体内过程呈现双峰现象,这与 Xiao 等^[37]研究中显示去氢土莫酸在茯苓提取物给药后单峰吸收、制剂给药后呈现双峰吸收结果相近,推测这一结果可能是由于肝肠循环^[38]。本研究中松苓新酸的体内过程呈现单峰吸收、消除缓慢的现象,与文献报道^[36,38]相近。另外,开心散中去氢土莫酸的含量是松苓新酸的 15.8 倍,但是去氢土莫酸和松苓新酸的 C_{max} 值接近,这一结果提示松苓新酸可能为更易被吸收的成分,值得关注。

茯苓新酸 A 和茯苓新酸 B 均为 3,4-开环-羊毛甾-7,9(11)-二烯型三萜,ig 开心散后,2 成分均被迅速吸收入血并且消除较慢,与文献报道^[36,38]相近。复方中,这 2 种成分的含量相近,但茯苓新酸 B 的 C_{max} 值、AUC 值、平均滞留时间 (MRT) 值等参数均高于茯苓新酸 A,这一结果提示茯苓新酸 B 可能更易被吸收入血,从而在体内发挥作用。另外,本研究结果显示给药开心散后松苓新酸、茯苓新酸 A 和茯苓新酸 B 的达峰时间均低于文献报道^[36]中给予茯苓醇提物后各成分达峰时间,这提示开心散复方可能促进茯苓三萜酸类成分吸收。

综上所述,本研究建立了同时测定大鼠血浆中开心散主要成分含量的 UPLC-MS/MS 方法,并将该方法成功地应用于开心散在 AD 模型大鼠体内的药动学研究。本研究明确了 AD 疾病状态下开心散中 α -细辛醚、 β -细辛醚、去氢土莫酸、松苓新酸、茯苓新酸 A 和茯苓新酸 B 这 6 种成分的体内药动学特征,为明确开心散的体内物质基础提供参考,并为开心散的临床应用以及后续研究提供借鉴。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 唐·孙思邈著,冯文全审校. 备急千金要方 [M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2019: 275.
- [2] 日·丹波康赖撰,高文柱校注. 医心方 [M]. 北京: 华夏出版社, 2011: 552.
- [3] 明·许浚. 东医宝鉴 [M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2014: 36.
- [4] 明·张介宾著. 景岳全书 (下) [M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2006: 1251.
- [5] Cao C, Xiao J Y, Liu M Q, *et al.* Active components, derived from Kai-Xin-San, a herbal formula, increase the expressions of neurotrophic factor NGF and BDNF on mouse astrocyte primary cultures via cAMP-dependent signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 224: 554-562.
- [6] Wang N, Jia Y M, Zhang B, *et al.* Kai-Xin-San, a Chinese herbal decoction, accelerates the degradation of β -amyloid by enhancing the expression of neprilysin in rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 3862342.
- [7] Yi P J, Zhang Z Y, Huang S Q, *et al.* Integrated meta-analysis, network pharmacology, and molecular docking to investigate the efficacy and potential pharmacological mechanism of Kai-Xin-San on Alzheimer's disease [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 932-943.
- [8] Nishiyama N, Zhou Y, Takashina K, *et al.* Effects of DX-9386, a traditional Chinese preparation, on passive and active avoidance performances in mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(11): 1472-1476.
- [9] 王彬斌, 冯晓晓, 恩特扎尔·别克, 等. 开心散对 APP/PS1 小鼠神经炎症和 $A\beta$ 沉积的作用研究 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7511-7519.
- [10] 韩国柱. 中草药药代动力学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1999: 3-7.
- [11] Wang W, Liao Q P, Quan L H, *et al.* The effect of *Acorus gramineus* on the bioavailabilities and brain concentrations of ginsenosides Rg₁, Re and Rb₁ after oral administration of Kai-Xin-San preparations in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(2): 313-320.

- [12] Wang X T, Zhang Y, Niu H B, *et al.* Ultra-fast liquid chromatography with tandem mass spectrometry determination of eight bioactive components of Kai-Xin-San in rat plasma and its application to a comparative pharmacokinetic study in normal and Alzheimer's disease rats [J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(10): 2131-2140.
- [13] Zhang X W, Li Q, Lv C X, *et al.* Characterization of multiple constituents in Kai-Xin-San prescription and rat plasma after oral administration by liquid chromatography with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(12): 2068-2075.
- [14] Lv C X, Li Q, Zhang X W, *et al.* Simultaneous quantitation of polygalaxanthone III and four ginsenosides by ultra-fast liquid chromatography with tandem mass spectrometry in rat and beagle dog plasma after oral administration of Kai-Xin-San: Application to a comparative pharmacokinetic study [J]. *J Sep Sci*, 2014, 37(9/10): 1103-1110.
- [15] Lv C X, Li Q, Zhang Y W, *et al.* A UFLC-MS/MS method with a switching ionization mode for simultaneous quantitation of polygalaxanthone III, four ginsenosides and tumulosic acid in rat plasma: Application to a comparative pharmacokinetic study in normal and Alzheimer's disease rats [J]. *J Mass Spectrom*, 2013, 48(8): 904-913.
- [16] 巴寅颖, 姜艳艳, 刘洋, 等. 基于远志 酮在记忆障碍模型大鼠体内药代动力学特性的远志及开心散药物属性研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(8): 549-553.
- [17] 巴寅颖, 姜艳艳, 刘洋, 等. 基于 3,6'-二芥子酰基蔗糖在记忆障碍模型大鼠体内表征的单体、远志及其经典方开心散药代动力学 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14): 138-142.
- [18] 巴寅颖, 姜艳艳, 吴霞, 等. 基于西伯利亚远志糖 A5、A6 体内表征的开心散与远志及单体药代动力学关联分析 [J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(10): 703-708.
- [19] Cao C, Xiao J Y, Liu M Q, *et al.* Active components, derived from Kai-Xin-San, a herbal formula, increase the expressions of neurotrophic factor NGF and BDNF on mouse astrocyte primary cultures via cAMP-dependent signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 224: 554-562.
- [20] Zhu Y, Chao C, Duan X Z, *et al.* Kai-Xin-San series formulae alleviate depressive-like behaviors on chronic mild stressed mice via regulating neurotrophic factor system on hippocampus [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1467.
- [21] Zhu Y, Duan X Z, Cheng X X, *et al.* Kai-Xin-San, a standardized traditional Chinese medicine formula, up-regulates the expressions of synaptic proteins on hippocampus of chronic mild stress induced depressive rats and primary cultured rat hippocampal neuron [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 193: 423-432.
- [22] Smriga M, Saito H, Nishiyama N. Hoelen (*Poria cocos* Wolf) and ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer), the ingredients of a Chinese prescription DX-9386, individually promote hippocampal long-term potentiation *in vivo* [J]. *Biol Pharm Bull*, 1995, 18(4): 518-522.
- [23] Wang B B, Feng X X, Liu S H, *et al.* Comprehensive quality assessment of Kaixin Powder by HPLC-DAD quantification and HPLC-QTOF-MS/MS confirmation [J]. *ACS Omega*, 2021, 6(17): 11319-11326.
- [24] Wang X Y, Sun G Q, Feng T, *et al.* Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression [J]. *Cell Res*, 2019, 29(10): 787-803.
- [25] Zhao N N, Sun C X, Zheng M, *et al.* Amentoflavone suppresses amyloid β_{1-42} neurotoxicity in Alzheimer's disease through the inhibition of pyroptosis [J]. *Life Sci*, 2019, 239: 117043.
- [26] George Paxinos, Charles Watson. 大鼠脑立体定位图谱 [M]. 诸葛启钊主译. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 2-9.
- [27] Facchinetti R, Bronzuoli M R, Scuderi C. An animal model of Alzheimer disease based on the intrahippocampal injection of amyloid β -peptide₍₁₋₄₂₎ [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1727: 343-352.
- [28] Xiong W, Zhao X Q, Xu Q, *et al.* Qisheng Wan Formula ameliorates cognitive impairment of Alzheimer's disease rat via inflammation inhibition and intestinal microbiota regulation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 282: 114598.
- [29] Yi P J, Zhang Z Y, Huang S Q, *et al.* Integrated meta-analysis, network pharmacology, and molecular docking to investigate the efficacy and potential pharmacological mechanism of Kai-Xin-San on Alzheimer's disease [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 932-943.
- [30] 毕婷婷, 战丽彬, 张栎婧. 基于中药整合药理学平台探究开心散治疗 AD 的物质基础与作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(16): 135-141.
- [31] Scheltens P, de Strooper B, Kivipelto M, *et al.* Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 2021, 397(10284): 1577-1590.
- [32] Hodson R. Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2018, 559(7715): S1.
- [33] Faborode O S, Dalle E, Mabandla M V. Exposure to

- footshock stress downregulates antioxidant genes and increases neuronal apoptosis in an A β (1-42) rat model of Alzheimer's disease [J]. *Neurochem Int*, 2021, 150: 105170.
- [34] Wang Z B, Wang Q H, Yang B Y, *et al.* GC-MS method for determination and pharmacokinetic study of four phenylpropanoids in rat plasma after oral administration of the essential oil of *Acorus tatarinowii* Schott rhizomes [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(2): 1134-1140.
- [35] 胡奎, 苏梦, 徐鑫, 等. 石菖蒲挥发油 β -环糊精、羟丙基- β -环糊精包合物在大鼠体内药代动力学研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2017, 28(2): 187-190.
- [36] Zhang J, Guo H M, Yan F L, *et al.* An UPLC-Q-Orbitrap method for pharmacokinetics and tissue distribution of four triterpenoids in rats after oral administration of *Poria cocos* ethanol extracts [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 203: 114237.
- [37] Xiao F, Li Q, Liang K, *et al.* Comparative pharmacokinetics of three triterpene acids in rat plasma after oral administration of *Poria* extract and its formulated herbal preparation: GuiZhi-FuLing Capsule [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(1): 117-124.
- [38] Qian Q, Zhou N, Qi P C, *et al.* A UHPLC-QTOF-MS/MS method for the simultaneous determination of eight triterpene compounds from *Poria cocos* (Schw.) Wolf extract in rat plasma: Application to a comparative pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1102-1103: 34-44.

[责任编辑 李亚楠]