

白芍总苷对胶原诱导性关节炎大鼠长期给药的组织分布研究

马 喆^{1,2}, 宋志敏^{1,2#}, 韩雅馨^{1,2}, 龚慕辛^{1,2*}, 仇 峰^{1,2}, 李 静^{1,2}, 贺 蕊^{1,2}

1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069

2. 中医络病研究北京市重点实验室, 北京 100069

摘要: **目的** 研究白芍总苷的主要成分芍药苷、芍药内酯苷对胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠长期给药后的组织分布。**方法** 建立超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法, 测定白芍总苷长期给药后大鼠心、肝、脾、肺、肾、小肠、胸腺、滑膜等组织中芍药苷和芍药内酯苷的分布情况。**结果** 长期给药后, 芍药苷和芍药内酯苷主要分布于小肠和肾, 其次为脾、胸腺、滑膜、肝、肺、心。2 种成分在 CIA 大鼠中的组织分布大多低于正常大鼠。**结论** 揭示了白芍总苷长期给药后的组织分布特征, 为探讨白芍总苷治疗类风湿性关节炎的靶器官以及疗效的改进提供了参考。

关键词: 白芍总苷; 胶原诱导性关节炎; 组织分布; 芍药苷; 芍药内酯苷

中图分类号: R285.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)10-3167-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.10.014

Tissue distribution of total glucosides of paeony after long-term administration in collagen-induced arthritis rats

MA Zhe^{1,2}, SONG Zhi-min^{1,2}, HAN Ya-xin^{1,2}, GONG Mu-xin^{1,2}, QIU Feng^{1,2}, LI Jing^{1,2}, HE Rui^{1,2}

1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

2. Beijing Key Laboratory of TCM Collateral Disease Theory Research, Beijing 100069, China

Abstract: Objective To study the tissue distribution of paeoniflorin and albiflorin, the main components of total glucosides of paeony, in collagen-induced arthritis (CIA) rats after long-term administration. **Methods** UPLC-MS/MS method was established to determine the distribution of paeoniflorin and albiflorin in heart, liver, spleen, lung, kidney, small intestine, thymus and synovium of rats after long-term administration. **Results** After long-term administration, paeoniflorin and albiflorin were mainly distributed in small intestine and kidney, followed by spleen, thymus, synovium, liver, lung and heart. The tissue distribution of the two components in CIA rats were mostly lower than that in normal rats. **Conclusion** The tissue distribution characteristics of total glucosides of paeony after long-term administration are revealed, which provides a reference for exploring the target organ of total glucosides of paeony in the treatment of rheumatoid arthritis and improving the curative effect.

Key words: total glucosides of paeony; collagen-induced arthritis; tissue distribution; paeoniflorin; albiflorin

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以多关节慢性炎症持续反复发作为特点的慢性、炎性、多系统性自身免疫性疾病, 目前具体机制依然不清, 尚无理想治疗手段^[1]。白芍总苷是从白芍 *Paeonia lactiflora* Pall. 根部提取的有效成分, 其主要成分为芍药苷、芍药内酯苷等单萜苷类成分^[2-3], 作为抗炎免疫调节药在临床上应用广泛, 治

疗 RA 具有疗效确切、耐受性好、不良反应少、适合长期应用的优点, 但也存在起效慢、疗效个体差异大的问题^[4-6]。为了明确白芍总苷的作用机制与直接起效物质, 目前国内外学者对白芍总苷相关成分及其制剂的作用机制以及白芍总苷给药后的体内过程和代谢产物进行了大量研究^[7-13], 取得了许多有价值的研究成果。然而, 与临床上白芍总苷治疗 RA

收稿日期: 2022-12-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81773860); 北京市教育委员会科学研究计划项目资助 (KM201910025021)

作者简介: 马 喆, 硕士研究生, 主要从事中药复方物质基础研究。E-mail: 1144938549@qq.com

*通信作者: 龚慕辛, 教授, 主要从事中药复方物质基础研究。E-mail: gongmuxin@126.com

#共同第一作者: 宋志敏, 博士研究生, 主要从事中药复方物质基础研究。E-mail: songzhimin00@163.com

长期用药的情况不同,目前对其体内过程研究多为单次给药或短期给药,缺乏白芍总苷长期给药后的组织分布研究。此外,已有针对白芍总苷药动学研究多采用正常动物,在模型动物中的研究很少。而据报道,白芍总苷在佐剂性关节炎模型大鼠和正常大鼠中的药动学行为存在显著差异^[12]。为了探讨白芍总苷长期给药的药动学特征,以及与起效靶点、作用机制之间的关系,本研究在前期工作基础上,建立了超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法,进一步模拟临床给药方案,测定白芍总苷长期给药后在胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)大鼠和正常大鼠的心、肝、脾、肺、肾等主要脏器以及小肠、胸腺、滑膜等免疫器官和主要病变组织中芍药苷和芍药内酯苷的组织分布,为探讨其起效部位和作用机制提供参考。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量(220±20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2015-0001。动物饲养于首都医科大学实验动物中心屏障环境内,室温 22~24℃,相对湿度 55%~60%,每日光照 12 h,自由饮水,实验前适应性饲养 7 d。伦理审查经首都医科大学实验动物伦理委员会批准(批准号 AEEI-2014-128)。

1.2 药品与试剂

白芍总苷胶囊(帕夫林,国药准字 H20055058,批号 210502)购自宁波立华制药有限公司,内容物 0.3 g/粒,含有 37.98%芍药苷、11.70%芍药内酯苷;对照品芍药苷(批号 PS161215-02,质量分数≥95%)、芍药内酯苷(批号 PS010200,质量分数>97.5%)购自成都普思生物科技股份有限公司;内标物盐酸丁螺环酮(批号 6-EOD-111-1,质量分数>98.0%)购自 TRC 公司;色谱级甲醇、乙腈、甲酸均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;分析纯乙酸铵(批号 631618,质量分数>98.0%)购自天津市致远化学试剂有限公司;娃哈哈纯净水购自杭州娃哈哈有限公司;牛源性 II 型胶原蛋白(批号 160425)、完全弗氏佐剂(批号 160410)、不完全弗氏佐剂(批号 160417)均购自美国 Chondrex 公司;EDTA 脱钙液(批号 E1171)购自北京索莱宝科技有限公司;苏木素-伊红(HE)染液(批号 G1005)、柠檬酸(pH 6.0)抗原修复液(批号 G1202)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA, 批号

G5001)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体(批号 GB11034)、组化试剂盒 DAB 显色剂(批号 G1211)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;中性树胶(批号 10004160)购自国药集团化学试剂有限公司;二抗(批号 K5007)购自 DAKO 公司。

1.3 仪器

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(美国安捷伦公司);QTRAP 6500 型三重四极杆串联液质联用仪(UPLC-MS/MS),ESI 源-电喷雾离子源,Analyst 质谱工作站软件(美国 Applied Biosystems 公司);MG-2200 型氮吹仪(日本 Eylea 公司);3K15 型离心机(美国 Sigma 公司);SI-T246 型漩涡振荡仪(美国 Spectral Instruments 公司);PRO200 型精密匀浆器(美国 PRO Scientific 公司);超低温冰箱(美国 Fisher Thermo Scientific 公司);DV215CD 型 1/10 万电子天平(上海奥豪斯公司);Matrx VMR 小动物气体麻醉机(美国 MIDMARK 公司)。

2 方法

2.1 CIA 大鼠模型的建立

依据课题组前期建立的方法造模^[14]。将牛 II 型胶原与完全弗氏佐剂按 1:1 比例混合乳化完全,并将 0.1 mL 该乳液皮内注射于大鼠尾部距离尾根部 1.5 cm 处。21 d 后,将牛 II 型胶原与不完全弗氏佐剂按 1:1 比例混合乳化完全,将 0.1 mL 该乳液皮内注射于大鼠尾部距离尾根部 1.5 cm 处。根据足部红斑和肿胀对关节炎的程度进行评分,4 个足爪的累计积分为关节炎指数(arthritis index, AI)。在造模第 28 天, AI≥4 的大鼠视为造模成功。

2.2 动物分组和给药

将正常大鼠随机分为正常组和白芍总苷低、高剂量(158、474 mg/kg)组,每组 12 只。并将 CIA 大鼠随机分为 CIA 组和 CIA+白芍总苷低、高剂量(158、474 mg/kg)组,每组 12 只。各给药组连续 ig 白芍总苷胶囊内容物 28 d,末次给药后 15 min、30 min、4 h、24 h 记录大鼠体质量并收集心、肝、脾、肺、肾、小肠、胸腺、滑膜组织样品,用生理盐水冲洗血渍并用滤纸吸去多余水分,记录新鲜、干净的各组织质量,通过器官质量与体质量的比值计算器官指数。取动物的后爪,储存在 10%中性福尔马林中。

2.3 HE 染色观察踝关节病理变化

大鼠后爪在 10% 中性福尔马林中固定 48 h 后, 用 20% EDTA 脱钙至骨软化, 乙醇脱水, 石蜡包埋, 然后沿纵轴切片, 进行 HE 染色, 于光学显微镜下观察并拍照。

2.4 免疫组化检测滑膜中 VEGF 表达

滑膜组织用 10% 中性福尔马林固定后, 乙醇脱水, 石蜡包埋, 用 3% H₂O₂ 孵育, 置于枸橼酸缓冲液中微波抗原修复。BSA 封闭后, 分别用 VEGF 抗体和二抗孵育, DAB 显色。切片用苏木精复染细胞核, 中性树脂胶密封并扫描。用 Image Pro Plus 6.0 软件对图像进行处理, 随机计量 5 个视野的阳性颗粒总量, 取平均值进行统计。

2.5 色谱条件

Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.1% 甲酸和 0.1% 乙酸铵的水溶液 (A) - 含 0.1% 甲酸的乙腈溶液 (B), 梯度洗脱: 0~1 min, 80% A; 1~2 min, 80%~60% A; 2~4 min, 60% A; 4~4.5 min, 60% A~100% B; 4.5~6.5 min, 100% B; 柱温 25 °C; 体积流量 0.3 mL/min; 进样体积 1 μL。

2.6 质谱条件

采用电喷雾离子源, 正离子模式检测, 多反应离子检测模式 (MRM) 扫描; 气帘气压力 40 psi (1 psi=6.895 kPa); 喷雾电压 3000 V; 离子源温度 120 °C; 雾化气压力 55 psi; 辅助气压力 55 psi; 射入电压 10 V; 碰撞室射出电压 13 V; 2 种成分及内标物的质谱工作参数见表 1。

表 1 LC-MS/MS 法测定白芍总苷中 2 种成分以及内标物的质谱工作参数

Table 1 Determination of mass spectrometry parameters of two components and internal standards in total glucosides of paeony by LC-MS/MS

成分	Q1 (<i>m/z</i>)	Q3 (<i>m/z</i>)	去簇电压/V	碰撞能量/eV
芍药内酯苷	481.0	197.4	100	18
芍药苷	498.0	179.0	35	22
内标	386.0	122.0	50	46

2.7 对照品溶液制备

精密称取芍药内酯苷、芍药苷对照品适量, 加入甲醇制成每种成分为 10 μg/mL 的混合对照品储备溶液, -20 °C 保存, 备用。取混合对照品储备液适量, 加色谱甲醇逐级稀释成 0.016、0.040、0.080、0.200、0.400、1.00、2.00、5.00、10.0 μg/mL 或 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、8.00、10.0、

20.0、30.0、40.0、50.0 μg/mL 的系列混合标准工作溶液。精密称取适量盐酸丁螺环酮, 用甲醇-乙腈 (1:1) 溶液制成丁螺环酮质量浓度为 0.05 μg/mL 的内标溶液。

2.8 组织样品制备

精密称定各种组织 0.5 g, 加入 3 倍量预冷的生理盐水, 冰水浴匀浆, 4 °C、5000 r/min 离心 15 min, 取上清液为组织样品匀浆液。精密吸取 100 μL 匀浆液, 依次加入 10 μL 甲醇、200 μL 质量浓度为 0.05 μg/mL 的丁螺环酮甲醇-乙腈 (1:1) 溶液, 涡旋混合 1 min, 4 °C、14 000 r/min 离心 10 min, 吸出上清液并氮气吹干, 临检测时加入 100 μL 甲醇, 超声 5 min 并涡旋 1 min 复溶, 4 °C、14 000 r/min 离心 10 min, 吸出上清液进样分析。

滑膜质地较坚韧且质量过小, 单个大鼠滑膜不足 0.02 g, 因此精确称取滑膜, 加入 30 倍量预冷的生理盐水, 冰浴匀浆。所得匀浆按照上述方法进行处理。

2.9 统计学分析

利用 Analyst 1.6 直接得到进样样品中的药物浓度 ($C_{\text{样品}}$), 参考以下公式计算出匀浆液中药物浓度 ($C_{\text{匀浆}}$), 并根据组织质量 ($W_{\text{组织}}$) 得到单位质量组织中的药物含量 ($C_{\text{组织}}$), 单位为 ng/g, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 SPSS v21 软件进行三因素方差分析, 评估各组参数值差异的显著性。

$$C_{\text{匀浆}} = C_{\text{样品}}$$

$$C_{\text{组织}} = C_{\text{匀浆}} \times V_{\text{匀浆}} / W_{\text{组织}}$$

V 为体积

3 结果

3.1 白芍总苷对 CIA 模型大鼠的药效学研究

3.1.1 白芍总苷对 CIA 大鼠 AI 的影响 正常组大鼠足部无明显红斑和肿胀 (AI=0)。与正常组比较, CIA 组大鼠在造模后第 14 天时足部红斑和肿胀程度增加 (AI=6.34±0.14), 在第 28 天关节炎指数进一步增加 (AI=9.63±0.14, $P<0.01$)。CIA+白芍总苷低、高剂量组大鼠足部虽也有红斑和肿胀, 但与 CIA 组比较, 在第 14 天 (CIA+白芍总苷低剂量组 AI=4.37±0.18, CIA+白芍总苷高剂量组 AI=3.87±0.24) 和第 28 天 (CIA+白芍总苷低剂量组 AI=5.99±0.26, CIA+白芍总苷高剂量组 AI=4.55±0.46) 时 AI 显著降低 ($P<0.01$), 说明白芍总苷能改善 CIA 大鼠关节炎程度。

3.1.2 白芍总苷对大鼠胸腺和脾脏指数的影响 如图 1 所示, 与正常组比较, 白芍总苷低、高剂量组

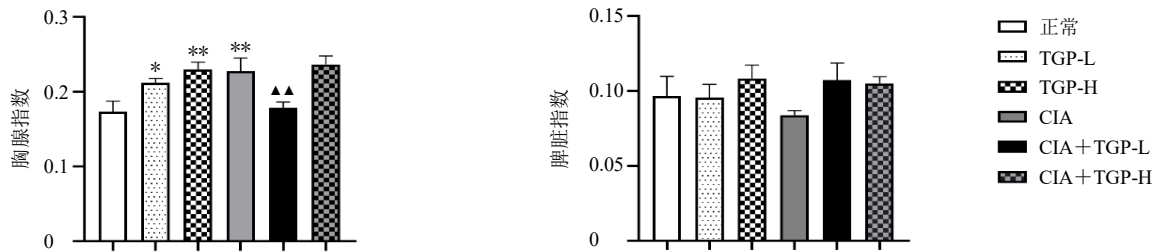
和 CIA 组脾脏指数显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)；与 CIA 组比较，CIA+白芍总苷低剂量组脾脏指数显著降低 ($P < 0.01$)，说明白芍总苷对 CIA 大鼠脾脏指数的影响可能与给药剂量有关，不同剂量白芍总苷的影响可能不同。本研究未观察到白芍总苷对正常和 CIA 大鼠胸腺指数的影响，但在课题组前期研究中发现白芍总苷给药 12 周后可降低大鼠胸腺指数^[13]，可能与本研究给药时间短有关。

3.1.3 白芍总苷对大鼠踝关节病理和滑膜中 VEGF 表达的影响 如图 2-A 所示，CIA 组关节面软骨被侵蚀，滑膜组织增生，表明模型组大鼠造模成功；白芍总苷可以保护关节软骨，抑制滑膜组织增生。如图 2-B、C 所示，正常组大鼠膝关节滑膜有少量

的 VEGF 阳性细胞表达，CIA 组 VEGF 表达显著升高 ($P < 0.01$)；与 CIA 组比较，CIA+白芍总苷低、高剂量组 VEGF 表达显著降低 ($P < 0.01$)。说明 CIA 大鼠滑膜中 VEGF 表达明显增加，白芍总苷可以明显抑制其增加。药效学实验证明 CIA 大鼠造模成功且白芍总苷对 CIA 大鼠具有较好的疗效，为后续进行组织分布研究奠定了基础。

3.2 方法学考察

3.2.1 专属性 比较从 6 只不同大鼠获得的空白组织、加混合对照品及内标的空白组织、白芍总苷末次给药后 24 h 采集的体内组织样本的峰，空白大鼠组织匀浆中的内源物不干扰芍药内酯苷、芍药苷的测定，方法专属性良好，各组织色谱图见图 3。



TGP-L-低剂量白芍总苷 TGP-H-高剂量白芍总苷 与正常组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；与 CIA 组比较：▲▲ $P < 0.01$ ，图 2 同
TGP-L-low-dose total glucosides of paeony, TGP-H-high-dose total glucosides of paeony * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs normal group; ▲▲ $P < 0.01$ vs CIA group, same as fig. 2

图 1 白芍总苷对大鼠胸腺和脾脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Effect of total glucosides of paeony on spleen and thymus indexes in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

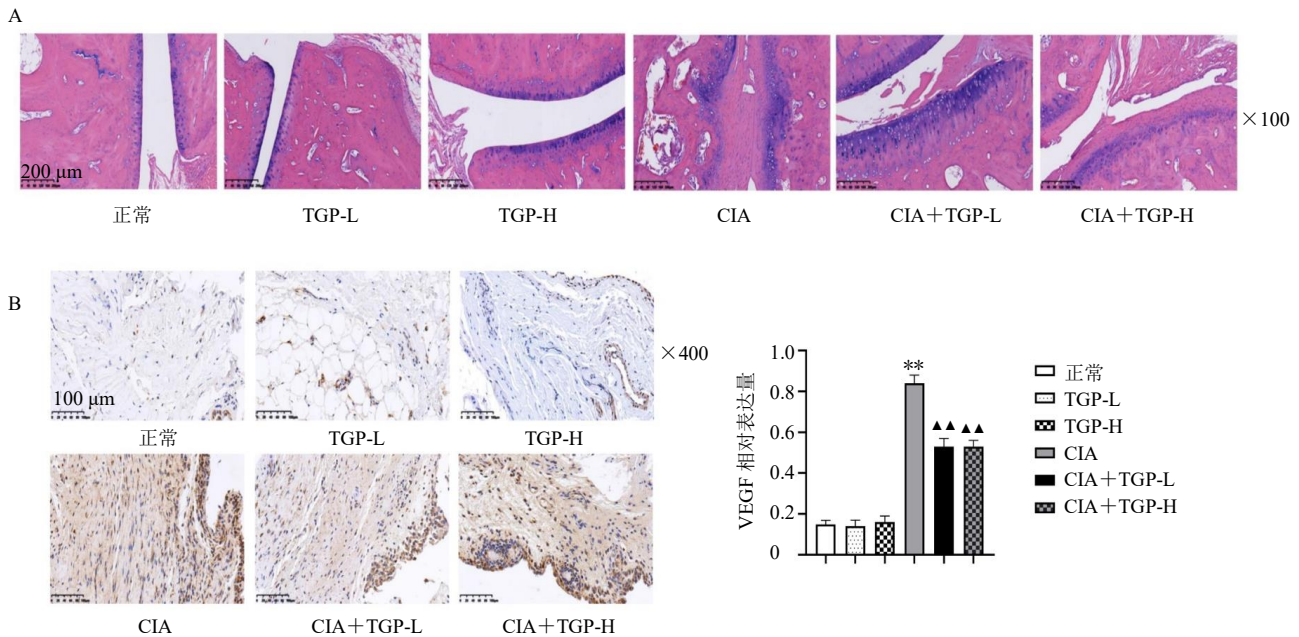


图 2 白芍总苷对大鼠踝关节病理 (A) 和滑膜中 VEGF 表达 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 2 Effect of total glucosides of paeony on ankle pathology (A) and VEGF expression in synovium of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

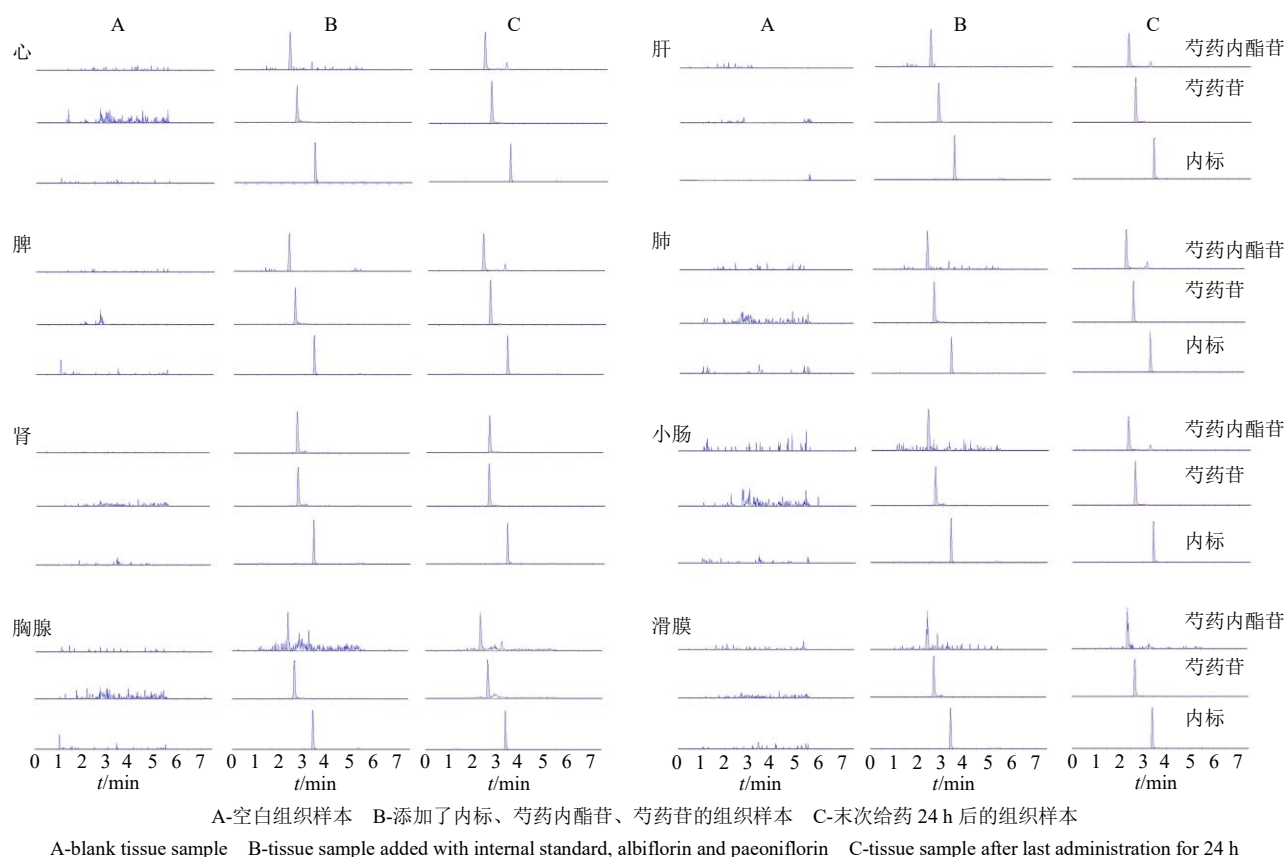


图 3 各组织中芍药内酯苷、芍药苷和内标的典型色谱图

Fig. 3 Typical chromatograms of albiflorin, paeoniflorin and internal standards in tissues

3.2.2 标准曲线与线性范围 分别取心、脾、肺、小肠、胸腺、滑膜空白组织匀浆液 100 μL ，再分别加入 10 μL 不同浓度的系列混合标准溶液和 200 μL 质量浓度为 50 ng/mL 的丁螺环酮甲醇-乙腈 (1:1) 溶液，其余操作按照“2.8”项下处理，配制成待测成分分为 1.60、4.00、8.00、20.0、40.0、100、200、500、1000 ng/mL 的系列组织样品；再分别取肝、肾

空白组织匀浆液 100 μL ，按照上述方法配制成待测成分分为 5.00、10.0、20.0、50.0、100、200、500、1000、2000、5000 ng/mL 的系列组织样品，以待测物浓度为横坐标 (X)，待测物与内标物丁螺环酮的峰面积比值为纵坐标 (Y)，以加权最小二乘法作线性回归，芍药内酯苷的权重为 $1/X^2$ ，芍药苷的权重为 $1/X$ 。各组织中各成分的回归方程见表 2。

表 2 白芍总苷在不同组织中的线性回归方程与线性范围

Table 2 Regression equations and linear range of total glucosides of paeony in different tissues

组织	成分	线性回归方程	r	线性范围/ $(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	定量限/ $(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$
心脏	芍药内酯苷	$Y=0.8941X+0.5369$	0.9981	1.60~1 000.00	0.80
	芍药苷	$Y=2.7405X+1.7336$	0.9994	1.60~1 000.00	0.32
肝脏	芍药内酯苷	$Y=0.0017X+0.0391$	0.9968	5.00~5 000.00	5.00
	芍药苷	$Y=0.0032X+0.0645$	0.9962	5.00~5 000.00	5.00
脾脏	芍药内酯苷	$Y=0.1079X+0.1238$	0.9981	1.60~1 000.00	0.80
	芍药苷	$Y=3.0952X+1.4996$	0.9972	1.60~1 000.00	0.32
肺脏	芍药内酯苷	$Y=0.9105X+0.3360$	0.9986	1.60~1 000.00	0.80
	芍药苷	$Y=2.7013X+2.1213$	0.9985	1.60~1 000.00	0.32
肾脏	芍药内酯苷	$Y=0.0020X+0.0292$	0.9980	5.00~5 000.00	5.00
	芍药苷	$Y=0.0036X+0.0219$	0.9992	5.00~5 000.00	5.00
小肠	芍药内酯苷	$Y=0.4410X+0.3899$	0.9975	1.60~1 000.00	0.80
	芍药苷	$Y=1.2942X+5.5005$	0.9973	1.60~1 000.00	0.32
胸腺	芍药内酯苷	$Y=0.7074X+0.4282$	0.9980	1.60~1 000.00	0.80
	芍药苷	$Y=1.8601X+4.1800$	0.9964	1.60~1 000.00	0.32
滑膜	芍药内酯苷	$Y=0.9172X+0.3190$	0.9962	1.60~1 000.00	0.80
	芍药苷	$Y=2.8686X+2.3777$	0.9994	1.60~1 000.00	0.32

3.2.3 精密度和准确度 按“3.2.2”项下方法操作, 分别制备心、脾、肺、小肠、胸腺、滑膜含芍药苷、芍药内酯苷的低、中、高质量浓度的质控样品(4.00、40.0、800 ng/mL)和肝、肾含芍药苷、芍药内酯苷的低、中、高质量浓度的质控样品(5.00、200、5000 ng/mL), 每个浓度制备的 6 个样品来自不同供体。

连续进样 3 d, 记录 2 种成分的色谱峰面积和内标峰面积的比值, 代入随行标准曲线算出相应的浓度, 计算批内精密度、批间精密度及准确度。各成分在组织中精密度和准确度测定结果见表 3。可见低、中、高 3 个质量浓度下 2 种成分在相应组织的精密度和准确度均小于 15%, 符合生物样品检测的要求。

表 3 采用 LC-MS/MS 法测定不同组织中成分的精密度和准确度 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Precision and accuracy of ingredients in different tissues by LC-MS/MS ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组织	成分	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)		精密度 RSD/%		准确度 RE/%
		理论值	实测值	批内	批间	
心脏	芍药内酯苷	4.00	4.11±0.20	4.8	4.9	2.7
		40.00	39.00±1.81	3.9	4.6	-2.4
		800.00	810.02±29.20	4.0	3.6	1.2
	芍药苷	4.00	4.11±0.24	6.9	5.8	2.7
		40.00	38.90±1.93	5.7	5.0	-2.9
		800.00	774.05±31.80	2.9	4.1	-3.3
肝脏	芍药内酯苷	5.00	4.99±0.34	7.0	6.9	-0.2
		200.00	209.21±8.86	4.3	4.3	4.5
		5000.00	5 263.03±172.00	2.8	3.3	5.3
	芍药苷	5.00	5.09±0.33	6.4	6.5	1.8
		200.00	209.31±8.95	4.1	4.3	4.5
		5000.00	5 226.22±174.00	3.1	3.3	4.5
脾脏	芍药内酯苷	4.00	4.17±0.24	2.8	5.7	4.2
		40.00	39.02±1.82	5.3	4.7	-2.4
		800.00	810.30±29.20	3.5	3.6	1.2
	芍药苷	4.00	4.04±0.22	7.1	5.4	1.0
		40.00	39.03±2.11	5.7	5.5	-2.5
		800.00	781.11±35.60	2.9	4.6	-2.4
肺脏	芍药内酯苷	4.00	4.11±0.27	6.3	6.7	2.7
		40.00	39.20±2.33	6.4	5.9	-1.9
		800.00	805.24±33.40	4.8	4.1	0.7
	芍药苷	4.00	4.15±0.23	6.7	5.4	3.8
		40.00	39.30±2.50	6.8	6.4	-1.8
		800.00	780.05±47.00	6.4	6.0	-2.4
肾脏	芍药内酯苷	5.00	4.97±0.46	8.2	9.2	-0.6
		200.00	194.02±11.80	6.2	6.1	-3.0
		5000.00	5 299.41±201.00	3.6	3.8	6.0
	芍药苷	5.00	4.84±0.37	6.6	7.5	-3.2
		200.00	198.06±15.20	7.6	7.7	-1.0
		5000.00	5 156.40±242.00	4.9	4.7	3.1
小肠	芍药内酯苷	4.00	3.95±0.32	7.0	8.1	-1.2
		40.00	41.00±2.28	5.1	5.6	2.6
		800.00	777.30±31.20	2.4	4.0	-2.8
	芍药苷	4.00	3.97±0.27	6.0	6.9	-0.7
		40.00	41.90±1.93	2.7	4.6	4.7
		800.00	769.20±38.60	3.0	5.0	-3.9
胸腺	芍药内酯苷	4.00	4.03±0.21	4.8	5.3	0.7
		40.00	39.00±1.81	3.9	4.6	-2.4
		800.00	810.30±29.10	4.0	3.6	1.2
	芍药苷	4.00	4.08±0.26	7.1	6.4	2.1
		40.00	38.90±1.93	5.7	5.0	-2.9
		800.00	774.11±31.80	2.9	4.1	-3.3
滑膜	芍药内酯苷	4.00	4.20±0.18	5.6	4.3	4.9
		40.00	39.80±2.43	6.1	6.1	-0.6
		800.00	810.20±37.00	5.2	4.6	1.3
	芍药苷	4.00	3.96±0.24	5.2	6.0	-1.1
		40.00	41.20±2.42	5.7	5.9	3.0
		800.00	841.22±33.00	3.9	3.9	5.1

3.2.4 稳定性 取空白匀浆液 100 μL , 按“3.2.2”项下方法操作, 分别配制低、中、高浓度的质量控制样品, 每个浓度制备 5 个样品。在室温放置 24 h 后进样, 考察室温下样品稳定性。样品预处理后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冻存, 然后取出室温下解冻, 如此反复冻融 3 次后进样分析, 考察 3 次冻融后的稳定性; 样品预处理后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存 30 d 后进样分析,

考察长期冻存稳定性。如表 4 所示, 在 3 种考察条件下, 低、中、高 3 个质量浓度不同成分在相应组织的精密度和准确度均小于 15%, 在所考察条件下稳定性良好。

3.2.5 提取回收率与基质效应 取空白匀浆液 100 μL , 按“3.2.2”项下方法操作, 分别配制低、中、高质量浓度的质控样品, 每个质量浓度分别使用来

表 4 采用 LC-MS/MS 法测定各组织中成分的稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Stabilities of ingredients in different tissues by LC-MS/MS ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组织	成分	质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	3 次冻融循环				30 d, -80 ℃				24 h 室温			
			实测质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)		RSD/%RE/%		实测质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)		RSD/%RE/%		实测质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)		RSD/%RE/%	
心脏	芍药内酯苷	4.00	4.02±0.08	2.0	0.5	4.10±0.10	2.5	2.6	4.12±0.24	5.8	3.0			
		40.00	39.70±1.48	3.7	-0.9	39.90±2.14	5.4	-0.3	38.10±2.21	5.8	-4.8			
		800.00	806.01±14.10	1.7	0.8	791.07±14.20	1.8	-1.1	810.34±42.00	5.2	1.2			
	芍药苷	4.00	4.03±0.12	3.1	0.8	3.96±0.10	2.6	-0.9	4.10±0.20	5.0	2.5			
		40.00	40.30±0.32	0.8	0.7	40.70±1.18	2.9	1.7	39.70±2.37	6.0	-0.7			
		800.00	804.03±18.60	2.3	0.5	819.31±16.50	2.0	2.4	813.21±41.60	5.1	1.6			
肝脏	芍药内酯苷	5.00	4.95±0.45	9.1	-1.0	4.67±0.32	6.8	-6.6	5.08±0.41	8.0	1.6			
		200.00	209.02±8.62	4.1	4.5	205.20±9.00	4.4	2.5	212.41±9.21	4.3	6.0			
		5000.00	5 234.20±216.00	4.1	4.7	4 684.04±22.00	4.7	-6.3	5 338.00±113.00	2.1	6.8			
	芍药苷	5.00	5.10±0.45	8.9	2.0	5.16±0.43	8.2	3.2	5.07±0.33	6.5	1.4			
		200.00	205.23±12.20	6.0	2.5	211.06±6.92	3.3	5.5	211.38±6.49	3.1	5.5			
		5000.00	5 418.21±225.00	4.2	8.4	4 652.00±215.00	4.6	-7.0	5 132.00±120.00	2.3	2.6			
脾脏	芍药内酯苷	4.00	4.02±0.08	2.0	0.5	4.10±0.10	2.5	2.6	4.12±0.24	5.8	3.0			
		40.00	39.70±1.48	3.7	-0.9	39.90±2.14	5.4	-0.3	38.10±2.21	5.8	-4.8			
		800.00	806.33±14.10	1.8	0.8	802.15±18.30	2.3	0.2	810.08±42.00	5.2	1.2			
	芍药苷	4.00	4.03±0.12	3.1	0.8	3.96±0.10	2.6	-0.9	4.10±0.20	5.0	2.5			
		40.00	40.30±0.32	0.8	0.7	40.70±1.18	2.9	1.7	39.70±2.37	6.0	-0.7			
		800.00	804.02±18.60	2.3	0.5	811.23±9.30	1.1	1.4	813.34±41.50	5.1	1.6			
肺脏	芍药内酯苷	4.00	4.08±0.18	4.4	2.1	4.10±0.09	2.3	2.5	3.98±0.24	5.9	-0.6			
		40.00	39.10±1.56	4.0	-2.3	38.90±1.14	2.9	-2.7	39.20±1.97	5.0	-2.0			
		800.00	794.42±14.40	1.8	-0.8	830.33±15.50	1.9	3.7	823.26±26.60	3.2	2.9			
	芍药苷	4.00	4.05±0.13	3.1	1.3	4.03±0.11	2.8	0.8	4.22±0.38	8.9	5.5			
		40.00	41.50±1.21	2.9	3.7	41.30±1.82	4.4	3.3	40.70±4.19	10.3	1.7			
		800.00	807.00±6.50	0.8	0.9	811.24±11.10	1.4	1.4	764.35±46.10	6.0	-4.4			
肾脏	芍药内酯苷	5.00	5.10±0.51	9.9	2.0	4.72±0.43	9.0	-6.0	5.11±0.33	6.5	2.2			
		200.00	193.00±8.80	4.6	-3.5	197.37±12.70	6.4	-1.5	192.42±14.70	7.7	-4.0			
		5000.00	5 178.06±299.00	5.8	3.6	4 888.20±152.00	3.1	-2.2	5 236.00±218.00	4.2	4.7			
	芍药苷	5.00	4.99±0.38	7.6	-0.2	5.20±0.35	6.6	4.0	5.05±0.44	8.6	1.0			
		200.00	196.27±13.00	6.6	-2.0	205.03±16.10	7.9	2.5	194.08±16.30	8.4	-3.0			
		5000.00	5 320.10±202.00	3.8	6.4	4 966.20±217.00	4.4	0.7	5 206.00±255.00	4.9	4.1			
小肠	芍药内酯苷	4.00	4.13±0.17	4.2	3.1	4.05±0.17	6.7	1.1	4.28±0.09	4.2	7.1			
		40.00	42.00±1.98	7.7	5.0	40.50±1.07	2.8	1.2	41.70±1.15	3.4	4.3			
		800.00	819.06±23.10	5.5	2.4	785.03±46.10	1.7	-1.9	781.40±11.90	2.4	-2.4			
	芍药苷	4.00	4.14±0.17	4.1	3.6	4.03±0.26	5.0	0.6	3.97±0.11	4.0	-0.7			
		40.00	41.10±2.22	10.5	2.7	41.50±1.18	3.3	3.8	42.80±0.49	1.7	7.0			
		800.00	797.09±15.20	4.8	-0.3	801.05±12.30	2.9	0.1	803.07±18.10	2.5	0.4			
胸腺	芍药内酯苷	4.00	4.08±0.20	4.9	2.1	4.21±0.20	4.8	5.2	4.12±0.13	3.1	3.0			
		40.00	38.30±1.12	2.9	-4.3	37.80±1.69	4.5	-5.6	40.20±1.01	2.5	0.6			
		800.00	797.36±26.30	3.3	-0.3	796.20±10.20	1.3	-0.5	821.39±22.60	2.8	2.6			
	芍药苷	4.00	4.02±0.16	4.1	0.6	4.12±0.23	5.7	3.0	4.19±0.40	9.5	4.8			
		40.00	40.20±2.33	5.8	-0.1	40.60±0.98	2.4	1.6	40.50±1.36	3.4	1.1			
		800.00	797.41±7.85	1.0	-0.4	805.21±15.40	1.9	0.6	826.35±43.70	5.3	3.3			
滑膜	芍药内酯苷	4.00	3.96±0.14	3.6	-1.0	4.17±0.16	3.7	4.3	4.19±0.09	2.1	4.7			
		40.00	40.10±1.87	4.7	0.2	38.00±0.89	2.4	-5.0	38.40±2.14	5.6	-3.9			
		800.00	809.37±12.50	1.5	1.1	781.22±20.40	2.6	-2.4	783.40±59.50	7.6	-2.1			
	芍药苷	4.00	4.04±0.17	4.3	1.1	4.21±0.19	4.4	5.1	4.07±0.26	6.5	1.8			
		40.00	41.02±1.07	2.6	2.6	41.90±1.75	4.2	4.7	43.10±1.01	2.3	7.7			
		800.00	809.33±28.70	3.5	1.1	828.32±10.60	1.3	3.5	846.22±26.90	3.2	5.7			

自不同供体的 6 个空白组织, 处理后进样分析获得相应峰面积值均值 (A_1)。

另取空白匀浆液 100 μL , 加入 10 μL 甲醇、200 μL 甲醇-乙腈 (1:1) 溶液, 制备得到不含内标的空白溶液, 离心后获得上清液, 氮气吹干, 加入 10 μL 甲醇、200 μL 内标溶液, 制成低、中、高 3 个质量浓度的未经提取的对照样品, 每个质量浓度分别使用来自不同供体的 6 个空白组织, 处理后进样分析

获得相应峰面积值均值 (A_2)。

取不同质量浓度的标准溶液加入内标溶液, 氮气吹干后用甲醇稀释成低、中、高 3 个质量浓度的标准对照样品, 每质量浓度制备 6 个样品, 获得相应峰面积均值 (A_3)。以 A_1/A_2 计算提取回收率, A_2/A_3 计算基质效应。如表 5 所示, 化合物的提取回收率为 89.57%~117.24%, 化合物的基质效应为 88.45%~109.24%, 说明该方法是稳定和可行的。

表 5 不同组织中 2 种成分的基质效应和提取回收率 ($n=6$)

Table 5 Matrix effect and extraction recovery of two components in different tissues ($n=6$)

组织	成分	质量浓度/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率		基质效应	
			平均值/%	RSD/%	平均值/%	RSD/%
心脏	芍药内酯苷	4.00	98.40	5.9	97.81	4.1
		40.00	104.32	4.1	96.93	1.4
		800.00	93.03	4.5	102.07	4.4
	芍药苷	4.00	102.32	5.1	103.30	4.8
		40.00	99.31	6.2	92.64	2.5
		800.00	92.12	2.0	98.52	3.1
肝脏	芍药内酯苷	5.00	93.81	6.8	102.09	7.3
		200.00	92.72	5.9	94.10	6.5
		5000.00	96.30	4.0	94.51	2.4
	芍药苷	5.00	88.52	8.0	98.73	7.5
		200.00	90.41	5.8	100.95	3.9
		5000.00	94.62	4.8	96.04	2.2
脾脏	芍药内酯苷	4.00	105.95	5.3	97.94	6.2
		40.00	103.57	1.4	95.45	2.7
		800.00	95.52	6.6	100.63	1.1
	芍药苷	4.00	113.64	2.7	95.48	5.8
		40.00	107.28	4.1	90.64	3.7
		800.00	95.73	5.1	97.93	2.1
肺脏	芍药内酯苷	4.00	104.99	5.3	97.93	6.2
		40.00	104.01	1.4	95.52	2.7
		800.00	95.52	6.6	101.02	1.1
	芍药苷	4.00	114.03	2.7	95.51	5.8
		40.00	107.24	4.1	90.63	3.7
		800.00	95.74	5.1	97.92	2.1
肾脏	芍药内酯苷	5.00	97.30	6.9	101.43	9.3
		200.00	94.52	6.8	95.52	4.8
		5000.00	107.97	2.8	108.37	2.5
	芍药苷	5.00	100.21	8.1	109.24	8.6
		200.00	95.51	6.2	93.92	6.2
		5000.00	109.21	3.1	105.28	3.6
小肠	芍药内酯苷	4.00	96.59	5.9	93.50	2.6
		40.00	101.66	1.5	91.69	1.4
		800.00	89.72	2.1	99.81	1.1
	芍药苷	4.00	97.10	3.0	93.01	2.7
		40.00	95.96	3.4	93.97	2.0
		800.00	94.37	3.2	96.77	1.6
胸腺	芍药内酯苷	4.00	95.65	7.8	92.93	2.6
		40.00	103.78	0.9	91.83	0.8
		800.00	103.04	2.0	88.45	1.8
	芍药苷	4.00	91.97	5.8	95.19	6.8
		40.00	93.66	3.4	90.30	2.7
		800.00	89.57	4.2	100.86	3.0
滑膜	芍药内酯苷	4.00	100.75	4.2	91.33	5.6
		40.00	105.10	2.6	95.95	3.4
		800.00	99.99	1.7	99.87	2.1
	芍药苷	4.00	93.56	5.2	94.10	4.7
		40.00	104.89	1.9	93.03	1.9
		800.00	99.94	2.1	100.88	3.2

3.3 组织分布研究

如表 6 所示,白芍总苷给药后在体内迅速分布,在 30 min 之内各组织芍药内酯苷、芍药苷含量达到峰值,说明这 2 种成分吸收较快,能够迅速达到各个组织,而在给药 24 h 后含量较少,说明其代谢速度较快,不易在体内蓄积。对比各组织之间成分含量可以发现,芍药内酯苷、芍药苷在小肠中的含量远高于其他各组织,肾脏中芍药内酯苷、芍药苷含量仅次于小肠,肾脏中的含量高这一结果从侧面说明了白芍总苷在大鼠体内消除快且滞留时间短。脾脏中芍药内酯苷、芍药苷含量也相对较高,结合药

效学研究结果可以发现,白芍总苷给药后可以降低 CIA 大鼠脾脏系数,加之本实验发现不同剂量给药后芍药内酯苷和芍药苷在 CIA 大鼠脾脏内的消除速度均较正常动物慢,这说明 CIA 大鼠白芍总苷多剂量给药后芍药内酯苷和芍药苷能更快地分布到脾脏,且在脾脏停留更长时间。而其他组织中芍药内酯苷、芍药苷含量相对较低,对比给药白芍总苷后芍药内酯苷、芍药苷含量可见各组织在同一时间点正常组和模型组大鼠存在一定差异,说明病理状态对大鼠的器官造成了一定的影响,从而影响了组织分布情况。

表 6 大鼠给药后组织分布 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Tissue distribution of rats after administration ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组织	成分	分组	质量分数/(ng·g ⁻¹)			
			15 min	30 min	4 h	24 h
心脏	芍药内酯苷	TGP-L	16.42±6.11	9.69±5.10	ND	ND
		CIA+TGP-L	13.72±8.72	5.70±3.71	ND	ND
		TGP-H	85.36±22.50**	54.16±6.81**	ND	ND
		CIA+TGP-H	71.31±7.00 ^{ΔΔ}	13.27±4.92 ^{##}	ND	ND
	芍药苷	TGP-L	112.07±38.90	61.93±43.10	ND	ND
		CIA+TGP-L	101.47±21.42	54.54±17.10	ND	ND
		TGP-H	364.46±28.41**	226.21±18.32**	ND	ND
		CIA+TGP-H	290.69±42.71 ^{ΔΔ#}	108.21±75.83 ^Δ	ND	ND
肝脏	芍药内酯苷	TGP-L	113.01±66.70	402.01±144.32	102.47±34.00	ND
		CIA+TGP-L	340.04±222.03	190.02±28.60	59.40±10.00	ND
		TGP-H	779.20±250.03*	248.11±103.11	161.08±61.81	ND
		CIA+TGP-H	600.50±173.01	728.01±65.91 ^{##}	73.20±16.72	ND
	芍药苷	TGP-L	501.60±196.00	891.12±278.09	118.32±35.60	ND
		CIA+TGP-L	1 218.04±289.01*	362.22±114.00*	63.42±12.00	ND
		TGP-H	2 466.23±686.20**	686.01±239.11**	90.12±19.30	ND
		CIA+TGP-H	2 360.62±426.01 ^Δ	1 225.03±143.11 ^{ΔΔ#}	129.43±48.43	ND
脾脏	芍药内酯苷	TGP-L	3 232.26±418.84	324.08±107.02	108.08±36.12	ND
		CIA+TGP-L	2 440.00±460.13	395.17±96.42	137.09±38.40	ND
		TGP-H	3 112.70±244.78	1 029.32±572.09	206.06±22.31*	ND
		CIA+TGP-H	2 496.07±895.94	3 399.23±781.02 ^{Δ#}	284.34±58.50 ^Δ	ND
	芍药苷	TGP-L	12 695.08±2 352.21	1 259.00±536.06	309.33±84.40	ND
		CIA+TGP-L	10 211.70±692.00	1 157.01±134.08	396.32±257.46	ND
		TGP-H	11 389.02±1 759.32	3 014.05±1282.03	355.06±103.22	81.00±9.33**
		CIA+TGP-H	12 154.44±2 969.11	2 718.26±804.39 ^Δ	1 063.00±467.06	ND
肺脏	芍药内酯苷	TGP-L	202.86±46.82	46.87±15.43	35.83±3.13	8.64±3.80
		CIA+TGP-L	331.16±112.01	144.65±44.52	37.33±9.90	38.37±2.93**
		TGP-H	203.54±101.99	573.79±161.82**	112.95±37.50*	17.16±1.51
		CIA+TGP-H	513.04±77.40 ^{Δ##}	41.58±21.70 ^{##}	49.45±23.81 [#]	32.42±9.22 ^{##}
	芍药苷	TGP-L	1 316.50±90.70	348.95±81.24	207.07±21.92	40.71±29.71
		CIA+TGP-L	1 725.20±620.50	395.32±113.81	111.66±42.91*	114.86±26.43*
		TGP-H	2 312.80±383.80*	4 117.90±128.73**	481.08±69.52**	59.51±12.60
		CIA+TGP-H	3 705.40±175.10 ^{ΔΔ#}	370.13±36.22 ^{##}	143.89±12.43 ^{##}	102.85±21.10

续表 6

组织	成分	分组	质量分数/(ng·g ⁻¹)			
			15 min	30 min	4 h	24 h
肾脏	芍药内酯苷	TGP-L	3 638.70±692.09	1 131.21±606.08	357.32±39.60	ND
		CIA+TGP-L	1 765.04±756.90*	2 101.02±938.09	910.43±218.09*	80.01±13.83**
		TGP-H	1 412.08±435.55**	4 013.00±1 838.49	2 743.34±390.07**	52.40±6.72**
		CIA+TGP-H	2 539.09±1 031.43	5 002.06±757.33 ^Δ	1 678.27±302.48 ^{Δ#}	ND
	芍药苷	TGP-L	13 726.99±1 877.34	4 328.29±1 912.09	2 089.05±539.09	43.30±13.84
		CIA+TGP-L	8 303.57±2 724.78*	7 915.06±775.41*	757.00±75.40*	92.21±15.14*
		TGP-H	4 169.34±566.43**	10 582.00±1 423.33**	3 471.21±697.07	60.72±24.31
		CIA+TGP-H	2 256.42±884.00 ^{Δ#}	14 772.48±2 210.00 ^{ΔΔ}	4 470.42±831.07 ^Δ	ND
小肠	芍药内酯苷	TGP-L	3 602.34±434.63	3 298.04±589.67	305.08±124.00	63.14±33.60
		CIA+TGP-L	1 975.70±491.97	1 887.16±541.39	171.35±9.10	76.77±37.84
		TGP-H	16 078.11±6 978.84**	3 668.88±1 496.90	381.01±67.90	47.94±5.92
		CIA+TGP-H	17 973.78±1 917.88 ^{ΔΔ}	6 790.90±2 569.20 ^{ΔΔ#}	650.71±202.10 ^{ΔΔ#}	32.53±12.14
	芍药苷	TGP-L	13 882.43±3 389.91	12 501.80±2 921.30	1 248.40±580.54	204.64±122.60
		CIA+TGP-L	9 622.60±3 121.61	6 485.30±1 560.60	289.00±48.51*	205.79±78.23
		TGP-H	40 858.77±5 786.00**	14 467.49±3 163.00	5 147.30±372.62**	193.26±49.51
		CIA+TGP-H	47 087.90±3 287.20 ^{ΔΔ}	23 000.30±7 294.01 ^{ΔΔ#}	2 221.15±137.10 ^{ΔΔ##}	128.63±43.30
胸腺	芍药内酯苷	TGP-L	785.34±192.40	309.51±168.21	35.29±15.52	20.31±4.60
		CIA+TGP-L	600.28±172.87	196.08±18.02	33.12±9.70	17.47±8.32
		TGP-H	1 443.20±293.52**	222.77±27.83	313.09±32.80**	48.48±25.40
		CIA+TGP-H	1 087.40±81.37 ^Δ	226.99±67.01	120.40±32.30 ^{ΔΔ##}	4.68±1.80
	芍药苷	TGP-L	5 225.80±742.93	2 305.80±443.90	269.38±60.10	45.80±12.91
		CIA+TGP-L	2 678.60±712.70**	1 308.40±71.70**	229.79±7.30	162.36±42.31**
		TGP-H	6 702.81±1 175.76	1 541.20±322.20*	1 537.72±327.54**	254.67±32.21**
		CIA+TGP-H	4 833.15±613.22 ^{Δ#}	1 855.50±44.30 ^Δ	638.24±152.42 ^{Δ##}	90.48±6.70 ^{Δ##}
滑膜	芍药内酯苷	TGP-L	63.60±28.81	352.58±14.90	308.43±163.33	ND
		CIA+TGP-L	279.30±31.51**	417.40±65.20	255.53±100.74	ND
		TGP-H	583.10±63.60**	1 514.01±533.01**	405.20±157.60	ND
		CIA+TGP-H	592.30±15.50 ^{ΔΔ}	466.20±76.13 ^{##}	635.40±183.42 ^Δ	ND
	芍药苷	TGP-L	537.10±114.70	2 752.96±435.20	1 523.80±349.84	199.43±47.30
		CIA+TGP-L	1 035.89±109.00*	1 458.38±110.50	2 020.21±458.31	445.90±94.91**
		TGP-H	2 533.00±347.50**	5 198.80±1 812.40*	1 760.52±128.52	355.00±19.00**
		CIA+TGP-H	2 399.91±111.30 ^{ΔΔ}	1 782.43±268.50 ^{##}	1 452.64±493.60	180.20±20.22 ^{ΔΔ##}

ND-未检测到; TGP-L-低剂量白芍总苷, TGP-H-高剂量白芍总苷 与 TGP-L 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 TGP-H 组比较: # $P < 0.05$

$P < 0.01$; 与 CIA+TGP-L 组比较: ^Δ $P < 0.05$ ^{ΔΔ} $P < 0.01$

ND-no detected; TGP-L-low-dose total glucosides of paeony, TGP-H-high-dose total glucosides of paeony * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs TGP-L group;

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs TGP-H group; ^Δ $P < 0.05$ ^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs CIA + TGP-L group

4 讨论

4.1 检测方法的优化

在正离子模式下分别对白芍总苷中 2 个组分进行检测, 发现在流动相中加入可促进各组分电离的乙酸铵后响应更好, 但含量较高时易析出沉淀, 堵塞色谱柱及仪器管道, 故选用 0.1% 乙酸铵。芍药苷浓度较高时, 易残留在色谱柱中, 可选用洗脱能力较强的乙腈, 并增长洗针时间。同时在流动相中加入 0.1% 甲酸, 可改善芍药苷拖尾的情况。

4.2 检测组织的选择

课题组前期研究表明, 白芍总苷长期给药能降低 CIA 大鼠的胸腺 (给药 12 周)、脾脏指数 (给药

8 周), 降低 CIA 大鼠 VEGF 的表达, 减轻滑膜病变, 同时发现白芍总苷可以显著降低 CIA 大鼠小肠组织的 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 含量, 下调小肠分泌型免疫球蛋白 A (secretory immunoglobulin A, SIgA) 分泌, 从而下调肠黏膜免疫应答, 并可以纠正 CIA 大鼠与正常大鼠相比的肠道菌群紊乱, 证明了白芍总苷对 CIA 大鼠的治疗作用可能与肠道有关。此外, 还发现白芍总苷可以改变血中的免疫相关指标^[14], 胸腺和脾脏是重要的免疫器官^[15], 滑膜是类风湿关节炎的重要病变部位^[16-17], 肠道黏膜免疫在类风湿性关节炎的治疗中具有重要作用^[18]。因此, 本实验测定了心、肝、脾、肺、肾等主要脏器

以及小肠、胸腺、滑膜等免疫器官和主要病变组织中的含量,以探究白芍总苷相关成分在正常和模型大鼠中的分布特征。

4.3 组织分布结果

本研究发现,白芍总苷中芍药内酯苷在 CIA 模型大鼠不同组织中的分布顺序为:肠>肾>脾>胸腺>肝>滑膜>肺>心,在正常大鼠不同组织中的分布顺序为:肠>肾>脾>滑膜>胸腺>肝>肺>心;白芍总苷中芍药苷在 CIA 模型大鼠不同组织中的分布顺序为:肠>肾>脾>胸腺>滑膜>肝>肺>心,在正常大鼠不同组织中的分布顺序为:肠>肾>脾>胸腺>滑膜>肺>肝>心。可见小肠组织芍药内酯苷和芍药苷含量均高于其他组织,结合课题组前期研究结果,进一步说明其可能是白芍总苷的主要作用部位。芍药内酯苷和芍药苷在肾脏中分布较多,这一结果侧面支持了白芍总苷在大鼠体内消除快且滞留时间短的结论^[19]。而芍药内酯苷和芍药苷在心脏、肝脏、脾脏、肺、胸腺和滑膜中分布较少。

芍药内酯苷、芍药苷在正常大鼠胸腺中分布较 CIA 组多。低剂量给药时,芍药内酯苷、芍药苷在正常组小肠内的分布多于 CIA 组;高剂量给药时,芍药内酯苷、芍药苷在正常组滑膜内的分布多于 CIA 组,这些结果可能与 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)的外排有关,P-gp 是一种能量依赖性药物外排泵,可以将细胞内的药物泵出细胞,从而降低细胞内的药物浓度^[20]。P-gp 主要分布于空肠绒毛的吸收细胞中,也存在于滑膜、脾脏、肺等组织中^[21],CIA 大鼠的滑膜、脾脏和肠道中 P-gp 的表达明显高于正常小鼠^[22]。大多数文献证明芍药苷是 P-gp 的底物^[23-25],有文献支持芍药内酯苷可能是 P-gp 的底物^[26],也有学者认为芍药内酯苷可能不是 P-gp 的底物^[27-28]。不同组织中 P-gp 含量和表达的差异可能是芍药内酯苷和芍药苷分布差异的原因之一。胸腺细胞中 P-gp 的活性和水平随着胸腺细胞的成熟和 CD3 表达的增加而增加^[29],而类风湿性关节炎可导致 CD3 水平升高^[30],因此 P-gp 的活性水平在模型组胸腺中可能高于正常组。值得注意的是,在高剂量给药时,CIA 组肠道组织中的芍药内酯苷和芍药苷比正常组分布更多,这表明除了 P-gp 之外,可能还有其他因素影响 TGP 主要成分的吸收。这些因素使剂量增加对分布的影响超过了 P-gp 的影响。

心脏和肝脏中芍药内酯苷和芍药苷的含量较

低,而已有的一些研究表明心脏和肝脏组织中芍药内酯苷和芍药苷的含量较高^[7-8],这可能是由于本研究中对心脏和肝脏组织进行灌洗,除去了大量血液导致。白芍总苷给药后,芍药内酯苷和芍药苷在尿中排泄迅速,但主要排泄途径为经胆汁排泄^[31],这也可能是肝脏中白芍总苷含量较低的原因。滑膜和胸腺上血供较少,但芍药内酯苷、芍药苷含量高于肝、心、肺,说明比起普通组织,芍药内酯苷和芍药苷更容易到达滑膜和胸腺,而其机制需要进一步研究。

综上,白芍总苷主要成分的生物利用度较低,多剂量给药后,广泛分布于大鼠的肠组织和肾脏,在心脏、肝脏、脾脏、肺、胸腺和滑膜中分布较少,并且发现芍药内酯苷、芍药苷在组织中消除较快,给药后 4~24 h 未检出成分或各组织中含量极低,说明白芍总苷主要成分原型不易在体内蓄积。白芍总苷主要成分在体内的快速清除提示应考虑每天多次给药,以维持体内药物水平。此前研究发现白芍总苷对 CIA 大鼠肠黏膜免疫有显著影响,结合芍药内酯苷、芍药苷在肠组织的大量分布,肠道组织可能是白芍总苷治疗 RA 的有效部位和靶点,白芍总苷有可能直接作用于肠道,维持肠黏膜的免疫平衡,发挥治疗作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chaudhari K, Rizvi S, Syed B A. Rheumatoid arthritis: Current and future trends [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(5): 305-306.
- [2] 牧亚峰, 向楠, 左新河, 等. 白芍总苷对自身免疫性甲状腺炎大鼠肠黏膜屏障及肠道菌群的影响 [J]. *中草药*, 2021, 52(11): 3269-3277.
- [3] 母会丹, 朱靖博, 丁燕, 等. 白芍化学成分的上行/下行-MS 分析 [J]. *分析实验室*, 2013, 32(7): 113-117.
- [4] Zhang X, Zhang D Y, Jia H J, *et al*. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment [J]. *Nat Med*, 2015, 21(8): 895-905.
- [5] Vaghef-Mehrabany E, Alipour B, Homayouni-Rad A, *et al*. Probiotic supplementation improves inflammatory status in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Nutrition*, 2014, 30(4): 430-435.
- [6] Liu X F, Zeng B H, Zhang J, *et al*. Role of the gut microbiome in modulating arthritis progression in mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 30594.
- [7] Zhao M M, Wang Q. Pharmacokinetic and tissue distribution

- studies of paeoniflorin and albiflorin in rats after oral administration of total glycosides of paeony by HPLC-MS/MS [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2014, 23(6): 403-411.
- [8] Fei F, Yang H L, Peng Y, *et al*. Sensitive analysis and pharmacokinetic study of the isomers paeoniflorin and albiflorin after oral administration of total glucosides of white paeony capsule in rats [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1022: 30-37.
- [9] 张玲非, 李向军, 王玉峰, 等. 白芍总苷在正常大鼠体内的组织分布研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(8): 1040-1046.
- [10] Jiang F J, Zhao Y L, Wang J B, *et al*. Comparative pharmacokinetic study of paeoniflorin and albiflorin after oral administration of *Radix Paeoniae Rubra* in normal rats and the acute cholestasis hepatitis rats [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(2): 415-421.
- [11] 张玲非, 刘敏彦, 潘会敏, 等. 白芍总苷在免疫性肝损伤大鼠体内的药代动力学研究 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(10): 1462-1466.
- [12] 袁秀泽, 邹盛勤, 王晓刚, 等. 白芍总苷在佐剂性关节炎大鼠与正常大鼠体内的药动学差异 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(20): 86-89.
- [13] 李雪岩, 韩星, 杨文宁, 等. 基于大鼠体内序贯代谢的白芍质控成分遴选研究 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(2): 329-337.
- [14] Peng J E, Lu X R, Xie K L, *et al*. Dynamic alterations in the gut microbiota of collagen-induced arthritis rats following the prolonged administration of total glucosides of paeony [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 204.
- [15] Zhao C B, Li X Y, Wu N, *et al*. Effect of *Arisaema erubescens* (Wall) Schott rhizome extract on rheumatoid arthritis [J]. *Trop J Pharm Res*, 2016, 15(4): 805.
- [16] Hu W, Xia L J, Chen F H, *et al*. Recombinant human endostatin inhibits adjuvant arthritis by down-regulating VEGF expression and suppression of TNF- α , IL-1 β production [J]. *Inflamm Res*, 2012, 61(8): 827-835.
- [17] Szekanecz Z, Besenyi T, Paragh G, *et al*. New insights in synovial angiogenesis [J]. *Joint Bone Spine*, 2010, 77(1): 13-19.
- [18] Zaiss M M, Wu H J J, Mauro D, *et al*. The gut-joint axis in rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2021, 17(4): 224-237.
- [19] Sun H J, Wang J F, Lv J. Effects of glycyrrhizin on the pharmacokinetics of paeoniflorin in rats and its potential mechanism [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 550-554.
- [20] 鞠晓畅. 胡桃楸茎枝水提物的体外吸收与代谢研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2019.
- [21] 范艳芳, 冯潜, 唐澜, 等. 野黄芩素 FVB/NCrlVr 小鼠磺酸化代谢特征研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2012, 47(18): 1493-1497.
- [22] 董冉冉, 王萌, 刘志东, 等. 微透析技术在中药成分体内分析研究中的应用 [J]. *中草药*, 2015, 46(20): 3117-3124.
- [23] Asano T, Kushida H, Sadakane C, *et al*. Metabolism of ipecac alkaloids cephaeline and emetine by human hepatic microsomal cytochrome P450s, and their inhibitory effects on P450 enzyme activities [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(6): 678-682.
- [24] 朱玲英, 沈红, 武洁. LC-MS/MS 法体外测定肝匀浆液中乌头碱及其代谢产物 [J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(11): 1923-1928.
- [25] Ji H Y, Liu K H, Lee H, *et al*. Corydaline inhibits multiple cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase enzyme activities in human liver microsomes [J]. *Molecules*, 2011, 16(8): 6591-6602.
- [26] Dogterom P. Development of a simple incubation system for metabolism studies with precision-cut liver slices [J]. *Drug Metab Dispos*, 1993, 21(4): 699-704.
- [27] Brendel K, Jay Gandolfi A, Krumdieck C L, *et al*. Tissue slicing and culturing revisited [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1987, 8(1): 11-15.
- [28] Teensma A, Beamand J A, Walters D G, *et al*. Metabolism of coumarin and 7-ethoxycoumarin by rat, mouse, guinea pig, cynomolgus monkey and human precision-cut liver slices [J]. *Xenobiotica*, 1994, 24(9): 893-907.
- [29] 刘利利, 张继瑜. 药物体外肝代谢模型的研究进展 [J]. *中国兽医学报*, 2018, 38(10): 2015-2019.
- [30] 尤杰, 赫蕾, 陈明苍, 等. LC-MS 法测定离体大鼠肝灌注模型中知母皂苷 B₂ 的含量及药动学研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2013, 24(1): 70-74.
- [31] 刘艳文. 甘草酸对中毒剂量下马钱子碱代谢动力学影响及解毒机制研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2010.

[责任编辑 李亚楠]