

博士学位论文



论文题目 白头翁皂苷主要活性成分的药代动力学研究

研 究 Th 姓 名

刘亚丽

指导教师姓名

杨世林 苏丹

专 业 名 称

药理学

研 究 方 向

药物代谢动力学

论文提交日期

2014 年 5 月



白头翁皂苷主要活性成分的药代动力学研究中文摘要

白头翁为毛茛科植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel 的干燥根，为传统的清热解毒中药，现代药理学表明其具有抗肿瘤活性，本研究以主要活性部位白头翁皂苷为研究对象，对其化学成分、药动学、组织分布、排泄以及肠道部位的吸收和代谢进行了系统研究，为该中药的现代临床应用和开发提供依据。研究内容如下：

**1**、提取分离及含量测定

利用制备色谱，动态轴向色谱获得具有抗肿瘤活性的白头翁皂苷 57 g，再对该

组分进行分离纯化获得 5 种成分，通过现代波谱技术鉴定了其结构，为齐墩果烷母

核的白头翁皂苷，课题组命名为 B3 (70 mg), BD (50 mg), B7 (70 mg), B10 (50 mg)和B11 (40 mg)。经 HPLC 归一化法检查纯度均达到 98% 以上，可作为白头翁皂苷对照品使用。在此基础上，对白头翁皂苷进行含量测定，经 HPLC-ELSD 分析，B3，BD， B7， B10 和 B11 的含量分别为 24.1%，7.4%，12.4%，13.5% 和 8.5 %。

**2**、药代动力学研究

首次建立了同时测定大鼠血浆中 B3, BD, B7, B10, B11 的 RRLC-MS/MS 法，以连翘苷为内标，采用 ESI 源负离子模式，多反应离子 (MRM) 监测进行分析。被测成分分别在 1.105~138 21(B3), 0.7508~93.84 (BD), 0.9960~124.88 (B7), 0.4148~51.84

(B10), 0.3322~41.52 (B11) ng·mL-1 范围内线性关系良好，定量下限分别为 1.105 (B3), 0.7508 (BD), 0.9960 (B7), 0.4148 (B10) 和 0.3322 (B11) ng·mL-1，待测物和内标的提取

回收率均大于 70%，方法的专属性、基质效应、精密度、准确度和稳定性均符合生物样品分析要求。采用所建立的方法测定了大鼠灌胃与静注两种给药途径下给予白头翁皂苷及其钠盐后 5 种主要成分的血浆浓度，获得了其在大鼠体内的药动学参数与

绝对生物利用度。灌胃给药后的 Tmax 分别为 0.33 (B3), 0.37 (BD), 0.51 (B7,B10,B11)

h,T1/2 分别为 12.81 (B3), 18.52 (BD), 16.31 (B7), 7.03 (B10), 12.54 (B11) h。静脉给药

后 T1/2 分别为 0.43 (B3), 2.23 (BD), 0.56 (B7), 0.35 (B10), 0.34 (B11) h。B3，BD，B7，

B10 和 B11 的绝对生物利用度分别为 1.16%, 1.17%, 0.55%, 0.96% 和 2.50%。结果表明：白头翁皂苷大鼠灌胃给药吸收迅速，消除较快，绝对生物利用度较低。

**3**、在体肠吸收研究

为了寻找白头翁皂苷口服相对生物利用度低的原因，建立了 HPLC-ELSD 法对其在大鼠体内的小肠吸收情况进行了考察。结果显示：5 种白头翁皂苷中 B3 和 BD 的吸收系数（*Ka*）*，*B3 和 B7 的渗透系数 (*Peff*) 在不同肠段具有显著性差异（*P*<0.05）。

5 种白头翁皂苷的渗透系数 (*Peff*) 在不同肠段的吸收为十二指肠>空肠>结肠>回肠， 十二指肠是该类皂苷的主要吸收部位。0.05~2.5 mg·mL-1 浓度范围内，5 种白头翁皂苷随着浓度提高出现过饱和现象。该类皂苷在十二指肠的渗透系数 (*Peff*) 与浓度间的线性关系不明显 (0.6007≤ r2 ≤0.7727)，说明白头翁皂苷不完全依赖浓度梯度转运，细胞膜上的载体蛋白参与了药物的转运过程，其小肠吸收机制并不完全为被动转运。加入地高辛后，白头翁皂苷的渗透系数明显降低，而加入维拉帕米后，渗透系数明显提高，其中

B3、BD、B7 和B11 有显著性差异 (*P*<0.05)，说明白头翁皂苷为 P-gp 底物。

**4**、组织分布研究

以 300 mg·kg-1 白头翁皂苷均匀分散混悬液单次灌胃给予大鼠后，对 B3, BD, B7, B10, B11 在动物体内的组织分布情况进行了考察。结果表明：白头翁皂苷在动物体内的分布迅速且广泛，给药 15 min 后，各组织脏器中即可检测到较高水平的药物浓度。 5 种皂苷在大部分组织器官中的达峰时间为 30 min，给药 2 h 后，白头翁皂苷的浓度逐渐下降，给药 6 h 后，药物基本消除，进一步说明其在体内不易蓄积。药物主要分布在心脏，肝，肺，肾，小肠等器官，心脏中药物浓度最高。在动物脑中亦可检测到药物的存在，证明其可以透过血脑屏障。

**5**、排泄研究

以300 mg·kg-1白头翁皂苷均匀分散悬浮液单次灌胃给予大鼠后，对 B3, BD, B7, B10, B11 原型药物的排泄情况进行了考察。主要研究白头翁皂苷在大鼠尿、粪和胆汁中的排泄量及累积排泄率。其结果显示给药后 0 ~ 18h，其在雄性大鼠胆汁中的累积排泄量分别为 12788.07 (B3), 2875.85 (BD), 2295.23 (B7), 1393.55 (B10),

635.46(B11) ng，分别相当于给药量的 0.7075‰, 0.5182‰, 0.2468‰, 0.1376‰ 和

0.09968‰，存在微弱的肝肠循环；在给药后的 0 ~ 108 h，药物在大鼠尿液中的累积

排泄量分别为 3791.25 (B3), 539.24 (BD), 875.38 (B7), 495.55 (B10), 255.95 (B11) ng，

分别相当于给药量的 0.2098‰, 0.0972‰, 0.0941‰, 0.0489‰ 和 0.0402‰；在给药后的 0 ~ 108 h，5 种皂苷在大鼠粪便中的累积排泄量分别为 5.791 (B3), 1.227 (BD),

3.194 (B7), 1.205 (B10), 1.042 (B11) mg，分别相当于给药量的 32.04%, 22.10%,

34.35%, 11.90%和16.34%，研究结果提示大部分药物未被吸收，直接以原型形式由粪便排出体外；被动物机体吸收的部分，在体内大部分也已被代谢掉，以代谢产物的形式排出体外。

**6**、肠道代谢研究

考虑到该类成分的分子量较大，不符合“five rules”法则，属于较难吸收化合物，并且大部分齐墩果烷型五环三萜皂苷未以原型形式被机体吸收利用，为了寻找白头翁皂苷在较低的生物利用度下能产生确切的抗肿瘤活性的原因，需要进一步对该类皂苷在肠道的代谢情况进行研究。

6.1、肠道降解动力学

建立HPLC-ELSD法，采用肠道内容物体外孵育的方法，对白头翁皂苷的肠道降解动力学进行了考察。结果表明白头翁皂苷在大鼠肠道中孵育结果符合一级降解动力学特征，48 h内白头翁皂苷B3, BD, B7, B10和B11迅速降解，降解速率常数(KA)为0.0794 (B3), 0.0523 (BD), 0.0539 (B7), 0.0426 (B10)和0.0468 (B11)，有效期(t0.9)



为1.327 (B3), 2.015 (BD), 1.955 (B7), 2.473 (B10)和2.251 (B11) h, 半衰期(t1/2) 为

8.730 (B3), 13.25 (BD), 12.86 (B7), 16.27 (B10)和14.81 (B11) h. 肠道菌群是白头翁皂

苷原型化合物发生代谢的重要因素。

6.2、肠道代谢产物初探

为进一步阐明白头翁皂苷在大鼠肠道菌群中发生降解后的代谢产物及代谢规律，采用UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS及Metabolite ID数据自动处理系统进行研究。结果显示，30小时内，正常大鼠肠内菌在实验条件下能有效代谢白头翁皂苷B3, BD, B7, B10, B11。实验发现8 种B3代谢产物，7 种BD代谢产物，8 种B7代谢产物，

7种B10代谢产物和9种B11 代谢产物。白头翁皂苷在肠道的体外代谢产物共计

40种。确证出该类成分在肠内菌群的作用下主要发生3-位侧链脱糖代谢，以及苷元母核上羟化，羧化和脱羧，甲基化和去甲基化等代谢反应。

关键词：白头翁皂苷； 药代动力学； 肠吸收； 组织分布； 排泄； 肠道菌群代谢

作者：刘亚丽

指导老师：杨世林、苏丹

**Pharmacokinetics Research on the Major Active Components of Pulsatilla chinensis (Bunge) Regel.**

**Abstract**

*Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel, the dried root of its original botany, has been used for 2000 years as an antipyretic traditional oriental medicine. Taking the saponins contained in *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel (PRS) as research subjects which are responsible for the antitumor activities, our research focused on their isolation and extraction, pharmacokinetics, absorption, tissue distribution, excretion and metabolism in the biological system, so as to provide more evidences for further clinical applications and development.

The major research content lists as follows:



**1. Extration, isolation and content determination**

Fifty seven gram of PRS which exerted potential antitumor activity has been extracted on preparative and dynamic axial chromatography. Then 5 oleanane pulchinenosides, which were named as B3 (70 mg), BD (50 mg), B7 (70 mg), B10 (50 mg) and B11 (40 mg) by our team, has been isolated and purified from this PRS by various modern spectroscopic techniques and chemical methods. These components whose purities were all above 98% determined by area normalization on HPLC could be used as reference substances for the content determination. Thereafter, the contents of B3, BD, B7, B10 and B11 in PRS were determined on HPLC-ELSD as 24.1%, 7.4%, 12.4%, 13.5% and 8.5 %, respectively.

**2. Pharmacokinetic research**

A simple, RRLC-ESI-MS/MS method was developed for the simultaneous determination of five oleanane pulchinenosides (B3, BD, B7, B10 and B11) in rat plasma for the first time. Applying forsythin as internal standard (IS), detection and quantitation were performed by MS/MS using electrospray ionization (ESI) and multiple reaction monitoring (MRM) mode. The 5 analytes showed good linearity for 1.105~138 21(B3), 0.7508~93.84 (BD), 0.9960~124.88 (B7), 0.4148~51.84 (B10), 0.3322~41.52 (B11)

Ng·mL-1, and the LLOQs for B3, BD, B7, B10 and B11 were 1.105 (B3), 0.7508 (BD),

0.9960 (B7), 0.4148 (B10) and 0.3322 (B11) ng·mL-1. Meanwhile, the recoveries of the

Analytes and IS were all above 70%. The specificities, matrix effects, precisions, accuracies and stabilities of the 5 components were validated in accordance with the guidance for the bioanalytical methods validation. The plasma concentrations of the 5 analytes for oral and intravenous administration in rat could be determined by the established method, then the pharmacokinetics parameters and bioavailabilities were obtained. After oral administration, Tmax were 0.33 (B3),0.37 (BD), 0.51 (B7, B10, B11) h, respectively; T1/2 were 12.81 (B3),

18.52 (BD), 16.31 (B7), 7.03 (B10), 12.54 (B11) h, respectively. After intravenous, T1/2

Were 0.43 (B3), 2.23 (BD), 0.56 (B7), 0.35 (B10), 0.34 (B11) h. The bioavailabilities of B3,

BD, B7, B10 and B11 were 1.16%, 1.17%, 0.55%, 0.96% and 2.50%, respectively. The results indicated that PRS exhibited rapid absorption and were eliminated quickly thereafter for oral administration. Therefor, the bioavailability were relatively lower.

**3. Intestinal absorption**



In order to search for the reason why the bioavailabilities were relatively lower, HPLC-ELSD was applied to explore the absorption mechanism of pulchinenosides (B3, BD, B7, B10, B11) in rats. The *Ka* value (B3, BD) and *Peff* value (B3, B7) displayed significant difference(*P*<0.05) in various intestinal segments. The *Ka* value and *Peff* value of PRS was different from each other with the highest absorption in duodenum (duodenum> jejunum> colon> ileum), so the duodenum was the main absorption site. The PRS displayed excessive satuation as the concentration increased over 0.05-2.5 mg·mL-1. There

Were no obvious linear correlations between *Peff* values and concentrations in duodenum (0.6007≤r2≤0.7727), which demonstrated PRS didn't entirely transported in a concentration dependent manner, and the transporter-protein involved the transportation,

So the intestinal absorption of the five pulchinenosides was not entirely passive diffusion. The *Ka* value and *Peff* value declined when the PRS was perfused with P-glycoprotein promoter digoxin, on the other hand, inclined when perfused with P-glycoprotein inhibitor verapamil with significant difference among PRS B3, BD, B7, B11 (*P*<0.05), which manifested that the PRS might be the substrates of P-glycoprotein.

**4. Tissue distribution**

The distribution of pulchinenosides (B3, BD, B7, B10, B11) in rats tissue has been investigated after 300mg·kg-1 oral administration of PRS evenly dispersed suspension. The results suggested that PRS exhibited rapid and extensive distribution, and high level concentrations could be detected in rats' tissues after 0.25 h for oral administration. Most

Of the Tmax of 5 components in the tissues were about 30 min, then the concentrations declined gradually after 2 h and a large proportion of PRS were almost eliminated after 6 h, which further indicated that PRS were difficult to accumulate *in vivo*. The medicine mainly distributed in heart, liver, lungs, spleen and small intestine, and it was highest in the heart than in other tissues. We can also detected PRS in the brain, which could demonstrated that PRS could transmitted across blood-brain barrier (BBB).

**5. Excretion**

The excretion of pulchinenosides (B3, BD, B7, B10, B11) in rats has been investigated after 300mg·kg-1 oral administration of PRS evenly dispersed suspension. The excretion amounts and accumulative excretion rates in rats' bile, urine and feces have been determined. The result showed that the accumulative excretions of PRS in male rats' bile



In 0-18 h after oral administration were 12788.07 (B3), 2875.85 (BD), 2295.23 (B7), 1393.55 (B10), 635.46 (B11) ng, equivalently 0.7075‰，0.5182‰，0.2468‰，0.1376‰

And 0.09968‰to the dosage, respectively, which demonstrated there was slightly enterohepatic circulation in rats; the accumulative excretions of PRS in male rats' urine in 0-108 h after oral administration were 3791.25 (B3), 539.24 (BD), 875.38 (B7), 495.55 (B10), 255.95 (B11) ng, equivalently 0.2098‰，0.0972‰，0.0941‰，0.0489‰and 0.0402‰to the dosage, respectively; the accumulative excretions of PRS in male rats' feces in 0-108h after oral administration were 5.791 (B3), 1.227 (BD), 3.194 (B7), 1.205 (B10), 1.042 (B11) mg, equivalently 32.04%, 22.10%, 34.35%, 11.90% and 16.34% to the dosage, respectively. The result suggested that a large proportion of PRS have not been absorbed and excreted with feces out of the body as the prototypes; the proportion which were absorbed in the body also have been metabolized and excreted with feces out of the body as the metabolite types.

**6. Intestinal metabolism**

Taking the factors into consideration that the molecular weight of PRS were relatively higher so as not to accord with" five rules", and were categorized as" hard to be absorbed" compounds, Meanwhile, most of which were not absorbed and utilized as the prototypes by the organism, it is necessary to further explore the metabolism of PRS in intestine to search for the reason why the bioavailabilities of PRS were relatively lower but exerted significant antitumor activity.

**6.1. Intestinal degradation dynamics**

The method of incubation with rat intestinal bacteria *in vivo* was applied to research the degradation dynamics of PRS on HPLC-ELSD. The result showed that PRS were in accordance with first-order reaction with rapid degradation in rat intestinal flora declined in 48 hours, and the degradation rate constants (*KA*) were 0.0794 (B3), 0.0523 (BD), 0.0539 (B7), 0.0426 (B10) and 0.0468 (B11), respectively; the t0.9 were 1.327 (B3), 2.015 (BD), 1.955 (B7), 2.473 (B10) and 2.251 (B11) h, respectively; the t1/2 were 8.730 (B3),

13.25 (BD), 12.86 (B7), 16.27 (B10) and 14.81 (B11) h, respectively. Therefor, rat intestinal flora was the most important factor on the metabolism of prototype compounds of PRS under experimental conditions.

**6.2. The primary exploration of metabolites in rat intestinal flora.**

The metabolites of pulchinenosides B3, BD, B7, B10 and B11 in rat intestinal flora have been researched on UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS and Metabolite ID data processing system. The result was that normal rat intestinal flora could metabolite B3, BD, B7, B10, B11 effectively under experimental conditions in 30 hours. 8 metabolites of B3, 7 metaboites of BD, 8 metaboites of B7, 7 metaboites of B10, 9 metaboites of B11 have been detected in rat intestinal bacteria, that was totally 40 metabolites. A variety of metabolite types have been concluded in intestinal bacteria mainly such as 3-side chain sugar-remove, hydroxylation, carboxylation and decarboxylation, methylation and demethylation on the parent nucleus of glycoside.



**Key words**: *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel saponins (PRS); Pharmacokinetics; Intestinal absorption; Tissue distribution; Excretion; Intestinal metabolism

**Written by: Liu Yali**

**Supervised by: Yang Shilin, Su Dan**

目 录

**[Abstract](#_Toc686206897)** 2

[第一章 前言](#_Toc686206898) 4

[1.1 中药药代动力学](#_Toc686206899) 5

[1.2 白头翁皂苷概述](#_Toc686206900) 6

[1.3 齐墩果烷型五环三萜类皂苷药代动力学综述](#_Toc686206901) 6

[1.4 立题依据与研究思路](#_Toc686206902) 15

[参考文献](#_Toc686206903) 15

[第二章 白头翁皂苷的化学成分及其含量测定研究](#_Toc686206904) 17

[2.1 仪器与材料](#_Toc686206905) 17

[2.2 色谱条件](#_Toc686206906) 17

[2.3 分离提取与鉴定](#_Toc686206907) 18

[2.4 白头翁总皂苷5种成分的含量测定](#_Toc686206908) 29

[2.5 讨论](#_Toc686206909) 32

[参考文献：](#_Toc686206910) 33

[第三章 白头翁皂苷在大鼠血浆中的药物动力学与绝对Th物利用度研究](#_Toc686206911) 33

[3.1 仪器与材料](#_Toc686206912) 33

[3.2 分析方法的建立与验证](#_Toc686206913) 34

[3.3 白头翁皂苷在大鼠血浆中的药物动力学和Th物利用度研究](#_Toc686206914) 46

[3.4 讨论](#_Toc686206915) 66

[参考文献](#_Toc686206916) 66

[第四章 白头翁皂苷的大鼠肠吸收研究](#_Toc686206917) 67

[4.1 仪器与材料](#_Toc686206918) 67

[4.2 分析方法的建立与验证](#_Toc686206919) 68



**[4.2.1](#_Toc686206919)** [标准溶液和肠吸收液的制备](#_Toc686206919)

**[4.2.1.1](#_Toc686206919)** [储备液和对照品溶液的制备](#_Toc686206919)

[以甲醇为溶剂，精密配制含白头翁皂苷 B3，BD，B7，B10 和 B11 分别为 3.180、](#_Toc686206919)

[0.4100、0.4900、0.2200 和 0.1600 mg·mL-1 的混合标准贮备液，置 4℃ 保存。](#_Toc686206919)

[分别精密量取白头翁皂苷储备液适量置 10 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度， 配置成白头翁系列标准溶液。如 Table4- 1。](#_Toc686206919)

[Table4- 1 Series of working solutions of five pulchinenosides](#_Toc686206919)

[working solutions](#_Toc686206919)

[B3 BD B7 B10 B11](#_Toc686206919)

**[4.2.1.2](#_Toc686206919)** [样品处理](#_Toc686206919)

[取肠吸收液 200 µL，甲醇 200 µL，SPE 柱分离，3 mL 超纯水淋洗，3 mL 甲醇](#_Toc686206919)

[4.3 白头翁皂苷的肠吸收研究](#_Toc686206920) 79

[4.4 讨论](#_Toc686206921) 83

[参考文献](#_Toc686206922) 83

[第五章 白头翁皂苷在大鼠体内的组织分布研究](#_Toc686206923) 84

[5.1 仪器与材料](#_Toc686206924) 84

[5.2 分析方法的建立与验证](#_Toc686206925) 84

[5.3 白头翁皂苷的大鼠组织分布研究](#_Toc686206926) 94

[5.4 讨论](#_Toc686206927) 103

[参考文献](#_Toc686206928) 104

[第六章 白头翁皂苷在大鼠体内的排泄研究](#_Toc686206929) 104

[6.1 材料与试剂](#_Toc686206930) 104

[6.3 白头翁皂苷的大鼠排泄研究](#_Toc686206931) 141

[6.4 讨论](#_Toc686206932) 167

[参考文献](#_Toc686206933) 168

[第七章 白头翁皂苷的肠道菌群降解动力学研究](#_Toc686206934) 168

[7.1 仪器与材料](#_Toc686206935) 168

[7.2 分析方法的建立与验证](#_Toc686206936) 169

[7.3 白头翁皂苷在大鼠肠道菌群降解](#_Toc686206937) 177

[7.4 讨论](#_Toc686206938) 181

[参考文献](#_Toc686206939) 181

[第八章 白头翁皂苷在大鼠肠道菌群中的代谢产物初探](#_Toc686206940) 181

[8.1 仪器与材料](#_Toc686206941) 182

[8.2 分析方法的建立和验证](#_Toc686206942) 182

[8.3 大鼠肠道菌群中白头翁皂苷及其代谢产物鉴定](#_Toc686206943) 183



[8.4 讨论](#_Toc686206944) 221

[参考文献](#_Toc686206945) 221

[结论白头翁皂苷主要活性成分的药代动力学研究](#_Toc686206946) 222

[结论](#_Toc686206947) 222

[攻读博士期间发表的论文](#_Toc686206948) 222

[缩略词表](#_Toc686206949) 222

## 第一章 前言

## 1.1 中药药代动力学

中药的药物代谢动力学（简称中药药代动力学，Tranditional Chinese Medicine

Pharmacokinetics），是指在中医药理论指导下，借助于动力学（kinetics）原理，研究中草药活性成分、组分、中药单方和复方体内吸收、分布、代谢和排泄（ADME, Fig.1-

1）的动态变化规律及其体内时量-时效（Fig.1- 2）关系，并用数学函数加以定量描述的一门边缘学科[1]。

中药与化学药品药代动力学相比，有其独特的特点，中药具有物质和生物活性的复杂性[2]，无论是复方还是单方都是一个复杂的系统，多个成分相互拮抗和协同产生综合作用，所以，研究时应考虑中医药整体观的理论基础。



设计有效成分的研究方法，阐明活性成分的ADME过程，采用HPLC、HPLC-MS、MS-MS等现代分析技术，开展中药体内过程动态变化的监测，有助于认识中药的活性成分与作用机制，阐明中药药效物质基础、揭示中药科学内涵，对中药新药创制、剂型改进以及方剂组分配伍机制的研究均发挥着十分重要的作用。

与化学药物药代动力学研究相同，阐明中药所含主要有效组分在机体内的ADME特性与机制，也是中药药代动力学需要解决的问题之一。由于在中医药理论和中药资源等方面的优势，创新中药研发将成为我国创新药物研发的主体模式，而在创新中药研发早期，通过药代动力学研究手段，对候选成分进行ADME研究，将极大提高创新中药研发的成功率与效率。

Action site" receptor”

Tissue bank combined

Binding

Free

Free

Binding

Absorption

Systemic circulation

Free drug

Biotransport

Excretion

Binding drug Metabolites

Metabolism

Biotransformation

Fig. 1- 1 The ralationship of ADME

Drug administration

Absorption

Pharmacokinetics

Distribute to tissues and organs

Blood concentration

Metabolic and excremental form



Distribution Elimination

Blood concentration at action site

Pharmacological effect

Clinic effect

Pharmacodynemics

Toxicity

Curative effect

Fig. 1- 2 The ralationship between pharmacokinetics and pharmacodynemics

## 1.2 白头翁皂苷概述

白头翁是一种传统退热中药，在中国和其他亚洲国家以根茎入药的悠久历史可以追溯到几个世纪以前，很早就被被收载于中国药典，具有“清热解毒，凉血止痢”的功效[3]。近年来，国内外对白头翁有效成分也有了较为深入的研究[4, 5, 6]，大量研究表明白头翁具有抗肿瘤重要作用[7,8,9,10,11]。有研究表明白头翁水提物可以抑制大鼠S180细胞、HepA肝癌细胞和Lewis肺癌细胞中肿瘤细胞的数量[12]，而其醇提物可以减少7721，hela, MKN-45[13] BGC-823, SW-116, LoVo, CaEs-17细胞[14]的增殖。同时，我们课题组近期也研究报道了白头翁皂苷活性成分在裸鼠肿瘤模型中具有潜在的抗肿瘤活性[15]。

皂苷是中药中常见的一大类生物活性物质，近年来越来越受到国内外学者的关注



[16,17,18]. 李川等[19]曾对中药皂苷类化合物的药代动力学研究现状进行过详细的归纳和

总结，涉及人参皂苷、甘草皂苷、薯蓣皂苷、黄芪皂苷和柴胡皂苷200多篇文献报道。近年来关于皂苷中的抗炎、护肝、抗肿瘤以及机体免疫调节等药理作用[20]也正陆续被人们所发现和应用。我们课题组的前期研究[15]发现白头翁总皂苷提取物具有抗肿瘤活性，并在此基础上对总皂苷进行分离、鉴定和构效关系的研究，结果表明5种齐墩果烷母核的白头翁皂苷（本课题组命名为白头翁皂苷B3，BD，B7，B10和B11）为白头翁总皂苷提取物的活性成分。

白头翁皂苷B3，BD，B7, B10和B11为五环三萜类皂苷。根据所含糖链数量，他们都归类为单糖链皂苷[20]。根据苷元类型，B3和BD为常春藤皂苷元类皂苷，B7，

B10和B11为齐墩果酸类皂苷。齐墩果烷型五环三萜皂苷是自然界十分重要的一类天然产物，许多中草药如白头翁、人参、三七、柴胡、紫菀、木通、牛膝、八月札等均含有齐墩果烷型五环三萜皂苷成分。齐墩果烷型五环三萜类皂苷的结构特征见Fig.1-

3. 构效关系表明其抗肿瘤活性与C-28位羧酸和C-3位侧链有关[21, 22]。本次研究的

5种皂苷都具有这样的结构特征，与文献报道一致。



**O**

**OH**

**R2O**

C-28

C-3

**R1**

Oleanolic acid type: R1=OH; R2=carbohydrate chain Hederasaponin type: R1=H; R2=carbohydrate chain

Fig. 1- 3 Chemical structures of the oleanane triterpenoidal saponin

虽然中药白头翁具有多方面的药理活性，特别是在抗肿瘤及抗炎的新药开发方面有很大的发展空间和应用前景。但是其作用机制非常复杂，至今未被充分阐明。药物发挥作用的形式和作用机制往往就体现在药物的代谢动力学研究，包括体内、在体、离体的吸收、分布、代谢和排泄，即机体对药物的处置过程研究，研究其药代动力学特征对更好地理解药物的药理和临床疗效至关重要。

鉴于此，本文就其所属的齐墩果烷型五环三萜类皂苷的药代动力学研究做一综述，掌握该类物质的吸收、分布、代谢、排泄等规律。以期为白头翁总皂的药代动力学研究提供理论和方法学参考。



## 1.3 齐墩果烷型五环三萜类皂苷药代动力学综述

五环三萜皂苷是一类重要的天然化合物，大多以游离或苷类的形式广泛存在于自然界。依据苷元的不同，五环三萜皂苷可分为齐墩果烷型、乌苏烷型、羽扇烷型、木栓烷型、羊齿烷型、异羊齿烷型、何帕烷型和异何帕烷型等多种不同类型的化合物。白头翁皂苷是齐墩果烷型五环三萜皂苷典型代表。

我国含齐墩果烷型五环三萜类皂苷成分的中草药资源非常丰富，但均因缺乏较为确切的药代动力学、明确作用于机体的主要活性成分以及作用机制研究，而得不到更好的开发应用。除此以外，齐墩果烷型五环三萜皂苷代谢转化的器官和酶系统多样化，导致其代谢产物在体内的浓度极低，直接从血浆、胆汁等生物体液中，分离检测其浓度具较大的难度。现代高灵敏分析技术的快速发展和先进的中药研究方法的不断改进，尤其是色谱-光谱联用技术(LC-MSn、LC-NMR等)的应用，将色谱技术强大的分

离能力和光谱技术提供的丰富结构信息结合起来，从而使体内多种微量代谢物的分离和鉴定成为一个连续的过程。多年来，关于齐墩果烷型五环三萜皂苷的结构和活性研究积累了一定的经验，齐墩果烷型五环三萜皂苷体内药动学研究已日趋活跃。

### 1.3.1 齐墩果烷型五环三萜皂苷的药物动力学研究

五环三萜结构上母核结构具有特殊性，其脂溶性较强，溶解度很小，使得其在亲脂性组织中分布较为广泛，而生物利用度较低，因此现有制剂在临床应用受到极大的限制。

齐墩果烷型五环三萜类皂苷的药动学特征见Table1- 1。

Table 1- 1 The pharmacokinetics of oleanane pentacyclic triterpenoids saponins



化合物实验动物给药方式中国男性志

药代动力学模型

药动学参数生物利用度文献

齐墩果酸

愿者

大鼠、小鼠、

口服400mg·kg-1 一房室模型(5.2±2.9) h(tmax)较低[23]

桦木酸

口服给药

犬

腹膜分别给予

\_ \_

开放型两房

\_ [24 ]

熊果酸（陆英）

三七总皂苷

大鼠

250、500mg·kg-1

口服(80.23mg·kg-1

大鼠

的陆英提取物）

0.15h和0.23h(tmax) \_ [25]

室模型

\_ 1.0 h(tmax),4.3h(t1/2)↑较低[26]

（人参皂苷

Rb1, Rg1 和

R1)

大鼠iv和ig二室模型

加冰片后，tmax↑Cmax↑；加维拉帕米tmax↓Cmax↓

较低(2.47%，

3.58%, 3.25%)

[27]

### 1.3.2 齐墩果烷型五环三萜皂苷的吸收

#### 1.3.2.1 齐墩果烷型五环三萜皂苷的吸收特点

药物的吸收是指药物从给药部位进入机体循环的过程，齐墩果烷型五环三萜皂苷类成分本身的理化性质、给药途径及吸收部位的生理、病理状况等因素在一定程度上决定着药物吸收的方式和程度。由于皂苷类成分的极性较大，膜透性较低，往往其口服生物利用度也不高[28, 29, 30]。如Liu等指出人参皂苷较弱的膜渗透性和胆汁主动外排是抑制大部分人参皂苷及其脱糖代谢物系统暴露率的主要原因[31]。药物跨膜转运方式取决于药物本身的性质、吸收部位的生理、病理特征。药物的转运可能采取单一转运机制吸收，也可能兼有几种转运方式，体内外多种模型研究显示，90%以上的药物主

要以被动扩散方式被机体吸收，少数可能存在主动转运。

#### 1.3.2.2 齐墩果烷型五环三萜皂苷的吸收研究方法

**a.**体外研究

体外研究药物的吸收包括了组织流动室法、外翻肠囊法、外翻环法、细胞培养模型。有研究采用Caco-2单层细胞模型系统性研究了中药三七中三萜皂苷吸收机制和影响吸收、处置的因素，发现多数皂苷的表观渗透系数*Peff*<3×107 cm·s-1，且*Papp*

（AP→BL） 与*Papp* (BL→AP) 基本相同，在大鼠体内大部分去糖基化发生在结肠部

位，但等离子水平的去糖基化比较低。表明中药三七中所含多数皂苷Ra3, Rb1等吸收属于被动转运[31]。也有研究采用Caco-2细胞模型研究柴胡皂苷A的吸收特性，发现各种外排蛋白抑制剂对其吸收没有影响，加入EDTA后其*Papp*显著升高，表明柴胡皂苷A不是P-gp及MRP外排蛋白的底物，其转运机制可能为跨细胞间隙被动转运[32]。有学者[33]采用肝微粒体模型，通过考察齐墩果酸的转运方式、吸收情况、代谢情况，表明齐墩果酸是由被动转运介导的跨膜转运，且渗透系数表明其肠吸收差，在微粒体中能为肝微粒体所代谢而不稳定，生物利用度较低，肠吸收较差。综上可发现多数齐墩果烷型五环三萜皂苷类成分以被动转运方式吸收。Gu等[34]通过研究人参皂苷在Caco-2单层细胞模型中的吸收特征，发现双侧*Papp*值均小于1×107 cm/s，且PDR约为9.83，表明人参皂苷细胞膜透过性较差，吸收方式可能为主动转运。综上所述可知部分齐墩果烷型五环三萜皂苷类成分以主动转运方式吸收。采用外翻肠囊模型研究白头翁总皂苷的在不同药物浓度和不同肠段药物的吸收特征的研究也有报道，陈振华等[35]通过HPLC测定外翻肠囊模型中样品成分常春藤皂苷元3-O-α-L-吡喃鼠李糖-(1→2) -[β-D-吡喃葡萄糖-(1→4)]-L-吡喃阿拉伯糖苷的质量浓度。结果表明：随药物质量浓度的增加，白头翁总皂苷成分在各肠段累积吸收量增加，药物在各个肠段的吸收差异不明显。由该实验可以看出齐墩果烷型三萜皂苷在大鼠肠道内存在特殊的“吸收窗”，可能为被动扩散吸收。



**b.**体内研究

研究药物体内吸收的方法除了体外法以外，还会运用到体内法。体内法通常是指机体在被给予药物之后测定体内药量或血药浓度及药中原型药物排泄总量，求算相关的药物动力学参数来评价药物吸收的速度和程度。Liao等[26]在一次给予大鼠灌服含熊果酸约50.23 mg·kg-1提取物后，测定其体内药物浓度，得到其究结果表明，熊果

酸体内吸收快，达峰时间较短，虽然给药剂量高，但进人体内后血药浓度却非常低，这可以预测，熊果酸在组织中分布广泛而血液中分布较少。

齐墩果烷型五环三萜类皂苷的吸收特征见Table1- 2，可以看出齐墩果烷型五环三萜皂苷的吸收以被动扩散为主，少数为主动转运。

Table 1- 2 The absorption characteristics of oleanane pentacyclic triterpenoids saponins

实验动物**（**给药方式**）/**

化合物

研究模型

转运机制结论文献

三七皂苷GF2和GF1的转运机制可

三七中三萜皂苷

Caco-2 单层细胞模

大部分三七皂苷（元）为被

能为主动转运，且为P-gp 和MRP2

（元）

动扩散（除GF2和GF1为主的底物；其余为被动扩散。Ra3, Rb1和[31]

型

齐墩果酸甘草皂苷

Caco-2细胞单层及肝微粒体模型

Caco-2单层细胞模型

动转运）

被动转运介导的跨膜转运



可能存在跨细胞间隙被动转运

Rd为三七皂苷的代谢标记物和主要活

性物质

渗透系数表明其肠吸收差，生物利用度较低

癸酸钠可能促使甘草酸二钾将细胞紧密连接打开，从而使药物吸收显著增加

[37]

[36]

甘草酸铵（通塞脉微大鼠在体肠循环灌流

丸）法

被动转运甘草酸铵主要以被动转运形式被吸收[37]

可能为跨细胞间隙被动转柴胡皂苷A不是P-gp及MRP外排蛋

柴胡皂苷A Caco-2 细胞模型

常春藤皂苷元

3-O-α-L-吡喃鼠李糖-(1→2) -[β-D-吡

运白的底物，转运过程不受外排蛋白影响

齐墩果烷型三萜皂苷在大鼠肠道内存

[36]

喃葡萄糖

-(1→4)]-L-吡喃阿拉伯糖苷

人参皂苷Rh2

大鼠外翻肠囊模型可能为被动扩散吸收

Caco-2 单层细胞模

可能为主动转运

型

在特殊的“吸收窗”

人参皂苷Rh2细胞膜透过性较差，吸收机制可能为主动转运

[39]

[38]

### 1.3.3 齐墩果烷型五环三萜皂苷在体内的分布

通常我们把药物从给药部位吸收进入血液后，由循环系统运送至体内各个脏器、组织、体液、细胞，这种药物在血液和组织之间的转运过程称为药物在体内的分布。动物经肠外给予皂苷类成分一般可在各组织器官内检测到原型成分，多数该类成分可以透过血脑屏障[38]。由于目前此方面研究尚浅，还没有发现皂苷类成分特有的分布规律。

静脉给予大鼠人参皂苷Rg1，药物在组织中5 min 左右达峰，在肝脏中分布最

多，在肾、心、肺、脾和胰腺中分布也较多，脑中分布较少[39]。尾静脉给予大鼠人参皂苷的代谢产物K，其稳态下的表观分布容积(*Vss*)为1677～2744 mL·kg-1，提示该化合物可能具有较好的组织分布[40]。在大鼠和犬体内RgⅣ均具有较低的清除率，在大鼠和犬类外周组织分布较差[41]。尾静脉给予大鼠羟基积雪草 苷

（Madecassoside, MD），发现其在体内迅速广泛分布（除生殖器官外），消除也较快。MD在肝脏和肾脏中含量最高，在脾脏、肠和胃中分布次之，在脑组织中检测到的MD较少，说明该化合物不易透过血脑屏障[42]。齐墩果酸胶囊在人体内进行药代动力学经拟合符合一房室模型，定量口服齐墩果酸后，结果表明，其含量远远大于正常人血容量，说明其较为广泛分布于血浆以外，或者在积聚体内某些组织中[27]。



齐墩果烷型五环三萜类皂苷的分布特征见Table1- 3，可以看出齐墩果烷型五环三萜皂苷在机体内分布较迅速和广泛，主要在肝脏和肾脏中分布较高，在脑组织中能检测到但是浓度较低，说明能有限度地透过血脑屏障。

Table 1- 3 The distribution characteristics of oleanane pentacyclic triterpenoids saponins

研究模型**/**给药方

化合物实验动物

结果文献

式

药物在组织中5min 左右达峰，在肝脏中分布最多，

人参皂苷Rg1大鼠尾静脉给药

在肾、心、肺、脾和胰腺中分布也较多，脑中分布较少

稳态下的表观分布容积(Vss)为1677～2744

[43]

人参皂苷的代谢产物K大鼠尾静脉给药

大鼠和犬

[44]

mL·kg-1，该化合物可能具有较好的组织分布

RgⅣ均具有较低的清除率，在大鼠和犬类外周组织

Rg Ⅳ

羟基积雪草苷

(Madecassoside, MD)

齐墩果酸

静脉给药

体

大鼠尾静脉给药中国男性

口服

志愿者

分布较差

在体内迅速广泛分布（除生殖器官外），消除也较快。

MD在肝脏和肾脏中含量最高，在脾脏、肠和胃中分布次之，在脑组织中检测到的MD较少

其较为广泛分布于血浆以外，或者在积聚体内某些组织中

桦木酸在鼠体内各组织器官中几乎均有分布， 而以肾

[44]

[46]

[27]

桦木酸CD-1大鼠腹膜给药

周围脂肪分布最多， 心脏和脑组织分布较少。

[29]

### 1.3.4 齐墩果烷型五环三萜皂苷的代谢

药物代谢是药物被机体吸收后，在体内各种酶以及体液环境作用下，发生一系列化学反应，同时使得药物化学结构也发生转变的过程。药物代谢分为了体内代谢和体外代谢，同时体内代谢又分为了肠道菌丛和肝脏代谢。此外，齐墩果烷型三萜皂苷类

成分也会在肝微粒体中的多种酶系的作用下，发生广泛的Ⅰ相和Ⅱ相反应。齐墩果烷型三萜皂苷类成分在体内的代谢途径通常以脱糖基化和羟基化为主，有时也会发生乙酰化、葡萄糖醛酸化等代谢转化。虽然大多数齐墩果烷型三萜皂苷类成分主要经各种酶系、菌群等转化为苷元而产生生物活性[43]，但是口服吸收较差以及机体代谢作用使得齐墩果烷型三萜皂苷类成分生物利用度普遍较低[44]。药物在吸收、分布、代谢和排泄的每个过程中，都有可能发生代谢转化，要全面阐明药物在体内的代谢过程，必须对药物在体内的各个阶段进行研究。

由于皂苷类化合物具有极性大、难挥发、相对分子质量大等特点，因此分离纯化及结构测定具有一定的难度[45]。

较多的研究报道了运用具有更高灵敏度和重现性的UHPLC-ESI-MSn检测皂苷，LC-MSn可以提供的结构信息在鉴定皂苷时更有优越性[46]。Tobias Madl[47]运用ESI-MS检测藜麦中三萜皂苷复合物，该类化合物与白头翁皂苷的苷元具有一定的相似性，都为五环三萜类皂苷中的齐墩果酸苷元和常春藤皂苷元。在ESI-MSn中，正离子检测模式下，皂苷的一级质谱均以钠加合离子[M+Na] +为基峰；在负离子检测模式下，皂苷的一级质谱均以准分子离子峰[M-H] -为基峰，可被用于质谱信息的提取。裂解的糖基碎片离子可以提供苷元信息和单糖形成的苷元侧链糖链的连接顺序。糖基上环形交叉裂解的碎片离子可以提供单糖与单糖之间的联系关系。不同的碱金属离子和皂苷加和物由于在气相中不同的亲和力从而表现出不同程度的裂解。UHPLC-ESI-MSn使研究皂苷分子结构、苷元、糖序列、化学转换、支链信息以及极微量成分成为可能。



在代谢研究中，UHPLC-ESI-Q-TOF-MS成为确证结构特征和裂解行为的有力工具[48]。其中Metabolite ID软件为处理药物代谢数据和自动提取重要和次要代谢产物的重组离子图谱。与Xcalibur software组合运用，Metabolite ID 2.0可以提高发现新药的效率。张文婷[49]在白黎芦醇和虎杖提取物在大鼠体内的药动学研究中采用Metabolite ID软件对大鼠口服给药虎杖和白黎芦醇后尿样进行了分析；滕艳妮[50]在莫吉斯坦药代动力学及体内代谢研究中利用HPLC-QTOF-MS技术分析莫吉斯坦大鼠生物样本，寻找可能的代谢产物，采用Agilent metabolite ID软件对系列代谢产物进行分析预测，得到可靠结果。

#### 1.3.4.1 齐墩果烷型五环三萜皂苷的代谢特征

Young等[51]采用高效液相色谱串联质谱电喷雾电离法研究桔梗皂苷D在人肠道菌群的代谢途径和代谢产物，发现桔梗皂苷D主要发生葡萄糖水解反应，苷元脱羟基反应以及乙酰化反应。有文献选取了*Nocardia* sp. NRRL-5646对6种五环三萜乌索酸、齐墩果酸、桦木酸、23 -羟基白桦酸、甘草酸、远志酸的代谢作用，发现可以使其C-28位羧酸发生甲酯化反应，该菌对6种物质均有代谢作用[52]。通过*Nocardia* sp NRRL-5646的培养体系分离纯化使23-羟基白桦酸、熊果酸及齐墩果酸甲酯化转化为23-羟基白桦酸甲酯、熊果酸甲酯、齐墩果酸甲酯，转化成极性较大的化合物进而排出体外来研究肠道菌群对齐墩果酸的代谢作用，并首次发现*Nocardia* sp NRRL-5646菌株特异性地将齐墩果酸、熊果酸、23-羟基白桦酸代谢为相应甲酯的代谢途径[53]。通过大鼠肝微粒体实验发现，60%齐墩果酸发生羟基化反应转化为极性较大的物质直接排出体外，肝脏代谢对其生物利用度影响较大。皂苷进入体内后，在体内代谢酶的作用，发生一系列变化，生成更利于吸收的中间体或者代谢产物，从而其提高生物利用率[37]。



#### 1.3.4.2 五环三萜类皂苷代谢研究方法

五环三萜皂苷在体内的生物利用度不高，不能直接入血，研究发现一般通过肠道菌群和肝脏的代谢，生成苷元而发挥其药理作用。虽然有见一些关于人参皂苷体内代谢的研究[54]，但是体内代谢研究存在生物样本的本底干扰、代谢产物复杂、样品难以纯化、不便于检测等而使得体内代谢研究具有相当的难度。体外代谢很大程度上避免了以上问题，可为进一步的体内代谢研究提供良好的借鉴。

**a.**体内研究

体内研究主要包括了药物探针法和体内指标法，受试动物给药后，测定药物及其代谢产物在血浆、尿粪便、胆汁等生理体液中的浓度，计算有关代谢参数，如清除率、生物半衰期等，分离鉴定可能的代谢产物，解析药物的代谢途径。Hasegawa等[55]发现，促使人参皂苷在体内代谢的另外一种人类肠道菌是普雷沃氏菌（ Prevotella

oris）。该菌能将人参皂苷Rb1和Rd水解成IBMⅠ；将Rb2水解成3-O-β-D-葡萄吡喃糖基-20-O-α-阿拉伯吡喃糖基(1→6) -β-D-葡萄吡喃糖基。

**b.**体外研究

体外法是利用离体生物组织样品，直接分析其药物代谢能力。包括了肝微粒体法

和细胞培养法。肝微粒体法适合代谢酶活性研究，方法简单，重现性好。细胞培养法可以克服组织难以获得的困难，可以较好的保持完整细胞的功能，与正常生理状况接近，并与体内具有一定相关性。

有文献研究表明人参皂苷在人工胃液中代谢反应主要发生脱糖反应和脱水反应，但较多的研究则表明只有脱糖反应发生[56]。这还有待于研究者进一步地考察，明确人参皂苷在人工胃液中的代谢路径。

#### 1.3.4.3 代谢规律

齐墩果烷型五环三萜类皂苷的代谢特征见Table1- 4，可以看出齐墩果烷型五环三萜类皂苷主要代谢位点为C-3位和C-28位，以脱糖为主，也有部分为甲基化、乙酰化或脱羟基反应；口服给药后，主要在粪便中检测到代谢产物，也有少数在血浆中能检测到代谢产物；口服给药后，在肠道内菌群作用下，较多出现糖苷键的断裂，微生物代谢中细胞内的单加氧酶，在五环三萜母核上引入羟基集团，发现C-7位是较易引入羟基的位点；主要通过代谢转化为代谢产物而产生药理活性，如甘草酸转化为甘草次酸，熊果酸转化为齐墩果酸发挥作用。由于五环三萜类皂苷结构上的相似，因而可以推断出，其不同类型底物的生物转化反应之间存在一定的相似性。



由于结构多样，代谢途径复杂，产物多，研究难度较大，大部分五环三萜皂苷体内代谢研究尚难以深入。

Table 1- 4 The metabolism characteristics of oleanane pentacyclic triterpenoids saponins

实验动物**（**给药方式**）/**

化合物

研究模型

发生代谢位点生物转化特征文献

乌樱丹烯(LA)荷兰猪(po) \_ LA→RLA [57,58]

B族大豆皂苷健康女性志愿者(po) \_ B族大豆皂苷→皂醇B [59]

C-3醚苷键，C-28酯苷

Rieinsdied C（黄花倒水莲根中）大鼠(po)

键

分解反应[60]

lancemaside A（轮叶党参）大鼠(po. iv) \_去糖基化反应水解为苷元[61]

大鼠（iv 甘草酸、po

甘草酸(GL)和甘草次酸(GA)

甘草次酸）

\_甘草酸→甘草次酸[62]

三七皂苷Rb1大鼠(po) \_氧化[63]

*Nocardia* sp

熊果酸、齐墩果酸以及其他五

环三萜皂苷甘草次酸

NR-RL-5646微生物

模型

多型毛菌(AS3.3443)

生物转化体系

C-28位甲酯化及C-C 键

断裂

\_

熊果酸→齐墩果酸[64]

\_ [65 ]

甘草酸(GL)肠道菌群孵育\_

1甘草甜素→甘草次酸；2甘草甜素→3-葡萄醛酸甘草次酸(GAMG)→甘草次酸

[57,66]

甘草酸(GL)和甘草次酸(GA)大鼠肝微粒体模型甘草次酸(GA)大鼠肝微粒体模型

甘草次酸(GA)人肝微粒体模型

Bacillue megaterium

\_

GA 的C-22α和C-24

单羟化代谢

\_

\_ [67 ]

\_ [68 ]

\_ [69 ]

桦木酸

ATCC 13368静悬细\_

胞悬浮液

微生物Fusarium lini

\_ [70 ]

齐墩果酸

C-28酯氧化\_ [71]

培养

葡萄糖、低聚糖水解反应，

桔梗皂苷D人肠道菌群孵育\_



乌索酸、齐墩果酸、桦木酸、

苷元脱羟基反应以及乙酰化反应

[72]

23-羟基白桦酸、甘草酸、远志酸

*Nocardia* sp NR-RL-5646

C-28羧酸甲酯化反应\_ [56]

柴胡皂苷→前柴胡苷元→

柴胡皂苷

远志皂苷

\_

*Nocardia*

sp. NRRL-5646

*Nocardia* sp.

\_

柴胡苷元

引入甲基使远志皂苷元→

\_

远志酸甲酯

[73]

[74]

齐墩果酸

NRRL-5646

\_甲酯化[75]

齐墩果酸大鼠肝微粒体模型\_羟基化[37]

*Nocardia*

熊果酸

sp. NRRL-5646

\_熊果酸→齐墩果酸[78]

脱糖基化，羟基化，乙酰化

齐墩果烷型三萜皂苷肝微粒体模型\_

和葡萄糖醛酸化

[47,48]

### 1.3.5 齐墩果烷型五环三萜皂苷的排泄

排泄是指体内药物或其代谢产物排出体外的过程[76]。药物经机体吸收、分布及代谢等一系列过程最终排出体外。机体对药物的排泄与内源性物质的排泄方式基本相同，其排泄的器官有肾、肝、胆、肠、肺及外分泌腺等，最主要的为肾排泄和肝胆排泄途径。大量文献研究也对此作出了印证。

皂苷类成分在动物体内大都经历一系列反应转化成水溶性较高的代谢产物，然后经尿液和胆汁排泄，少部分药物是以原型的形式排出体外。如韦凤华等[77]以Wistar

大鼠为模型动物研究皂苷类在体内的排泄情况，分别iv和ig给予一定量的人参皂苷Rg1溶液，按时收集其排泄物（尿液与粪便），预处理后用高校液相色谱(HPLC)检测。研究发现iv给予大鼠人参皂苷Rg1溶液后，有47.46%的原型药和代谢产物通过粪便排出体外，而51.31%的药物以代谢产物的形式通过尿液排出体外；ig给予大鼠人参皂苷Rg1溶液后，绝大部分Rg1都被代谢，排泄物中仅有9.04%的原型药物，有82.82%的以代谢产物直接通过粪便排出。杨秀伟等[78]采用反相高效液相色谱(HPLC) -紫外检测器(UVD) 法测定大鼠胆汁、粪便和尿液中的人参皂苷

Rg2；结果发现给大鼠静脉注射人参皂苷Rg2后，24 h内粪便中原型人参皂苷Rg2累积排泄量为给予剂量的22.16%；尿液中未检出人参皂苷Rg2。结果表明：静脉给予大鼠人参皂苷Rg2，少部分原型药物主要通过胆汁和粪便途径排出体外。



但也有部分报道皂苷类药物主要以原型的形式排除体外，如邴飞虹等[79]采用同位素追踪法研究氚标记的蜈蚣三七有效成分W3 (H-W3)单次ig给药后在小鼠体内的药代动力学过程。研究发现蜈蚣三七皂苷主要经粪便排泄，12 h内粪便中放射性的回收量为总消除量60%左右，单次ig给药后在小鼠体内的动力学过程符合一室模型。Güçlü- stündaÖ等[20]采用HPLC－ELSD法测定大鼠排泄物胆汁、粪和尿中伪人参皂苷R0，研究大鼠舌下静脉给药伪人参皂苷GQ后，其在胆汁、粪和尿中的排泄情况，发现人参皂苷R0大鼠舌下静脉给药后胆汁排泄占总药量的41.60%；其次为粪排泄，占总药量的9.97%；尿液中仅检出少量伪人参皂苷R0。结果说明大鼠胆汁、粪便和尿液主要以伪人参皂苷原型药物排泄。

齐墩果烷型五环三萜类皂苷的排泄特征见Table1- 5，可以看出齐墩果烷型五环三萜类皂苷的原型和代谢物主要通过粪便排泄，也有部分以胆汁排泄为主，如伪人参皂苷R0；被机体吸收的部分，在体内大部分被代谢，以代谢产物的形式排出体外。

Table 1- 5 The excretion characteristics of oleanane pentacyclic triterpenoids saponins

化合物实验动物**/**给药方式检测物质结论文献

人参皂苷

Rg1

Wistar大鼠（静脉注射、灌胃）

尿液与粪便

iv, 51.31%的药物以代谢产物的形式通过尿液排出体外；ig, 82.82% 以代谢产物直接通过粪便排出

[81]

人参皂苷

大鼠（静脉注射）

胆汁、粪便和尿静脉给予大鼠人参皂苷Rg2，少部分原型药物主要通过

[81]

Rg2

三七有效成

液

氚标记的蜈蚣（W3

胆汁和粪便途径排出体外

（H-W3）单次灌胃

分

给药）

粪便主要经粪便排泄[79]

伪人参皂苷

R0

大鼠（舌下静脉给药） 胆汁、粪和尿大鼠胆汁、粪便和尿液主要以伪人参皂苷原型药物排泄[20]

#### **1.3.4.5** 齐墩果烷型五环三萜皂苷的药代动力学特征

齐墩果烷型五环三萜类成分的吸收普遍较差，Egan等[80]预测药物被动肠吸收特点的规则：①氢键给体（连在N和O上的氢原子数）多余5个；②相对分子质量大于500；③油水分配系数logP大于5；④氢键受体（N和O的数目）大于10。当物质符合任意以上2个条件时，可认定其吸收较差。五环三萜类成分的极性普遍较大，分子量普遍大于500，生物膜透性较差，吸收较差，这是该类物质生物利用度较低的主要原因。该类物质在体内主要经各种酶系、菌群等转化为分子量和极性都较小的苷元而产生生物活性[81]。

总结齐墩果烷型五环三萜类皂苷的药代动力学规律我们不难看出，其吸收以被动扩散为主，少数为主动吸收，或两种方式兼而有之[35]；吸收入机体后很快在血中能被检测到；在各组织中分布较广泛，主要在肝肾中分布，能有限度地透过血脑屏障；然后主要通过C-3位和C-28位发生代谢转化为具有生物活性的代谢产物；最后以原型或者代谢产物的形式主要通过粪便排出。

通过对齐墩果烷型五环三萜类皂苷的代谢动力学研究进行归纳和总结，发现其吸收、分布、代谢和排泄规律，寻找中药在体内的动态变化规律及时量--时效关系，可以为白头翁皂苷的药代动力学研究提供有价值的参考和依据。



## 1.4 立题依据与研究思路

癌症是目前危害人类生命健康的严重疾病之一，世界卫生组织统计资料表明，世界癌症约占全球总死亡人数的12%以上，并逐年呈上升趋势，由于目前治疗药物一般均伴随着严重的毒副反应，在天然药物中寻找有效的抗肿瘤药物，已在国内外医药界达成了共识。本课题组前期所完成的白头翁抗癌活性部位的筛选结果显示[15]，白头翁皂苷为白头翁的抗癌活性部位，具有直接抑制或杀灭肿瘤细胞，诱导肿瘤细胞凋亡，抑制癌细胞生长的抗癌效应，具备高效低毒治疗优势。其相关制剂的进一步研制和开发无疑将为临床提供很有前途的抗癌新药。

本课题组已完成了白头翁中主要皂苷成分的构效关系研究，23-羟基及28-羧基是该植物中皂苷类成分发挥抗肿瘤活性的关键结构和基团。确定了齐墩果烷型五环三萜皂苷为抗肿瘤主要活性成分。然而，这类成分的药物代谢动力学(PK)研究尚未见国

内外文献报道。

中药新药的研发离不开PK研究，中药PK 特征参数（如半衰期、清除率、表观分布容积、生物利用度以及尿药排泄速率等）已成为中药作用机制阐述的重要依据，并为后期中药剂型设计优选和质量评价提供基础。对白头翁皂苷药物代谢动力学的研究，是进一步深入研究白头翁皂苷抗肿瘤药效物质基础的前提，是后续给药途径、给药方法、给药剂量的制定，以及制剂设计的必然要求。

本课题以阐明白头翁皂苷的药物代谢动力学过程为目标，利用现代色谱(HPLC-ELSD)、色谱–质谱联用(RRLC-MS/MS, RRLC-TOF/MS)技术，建立快速、灵敏和准确的药物体内含量测定方法；研究白头翁皂苷在实验动物体内的吸收、分布、代谢和排泄（ADME）全过程：获得其包括生物利用度在内的主要药动学参数，了解其在不同组织器官中的分布水平，考察其在动物体内的排泄情况和蓄积程度，通过肠道菌群孵化实验确定白头翁皂苷在肠道内的主要代谢途径、代谢产物及其结构；以期为更多相关制剂的研制开发提供药动学结果依据；为对其进一步化学结构改造寻找其他活性药物提供参考；为临床应用过程中对其制定更加安全、合理、有效的用药方案提供理论基础。



参考文献

[1] 刘昌孝. 中药药代动力学研究的难点和热点[J]. 药学学报, 2005, 40(5): 395-401.

[2] Yuan R, Lin Y. Traditional Chinese medicine: an approach to scientific proof and clinical validation [J]. *Pharmacol Ther*, 2000, 86(2): 191-198.

[3] 中国药典[S].一部. 2010: 96.

[4] 丁秀娟. 中药白头翁化学成分研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2010.

[5] 刘雅萱. 中药白头翁的化学成分研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2010.

[6] 舒展. 中药白头翁化学成分研究(二) [D]. 苏州: 苏州大学, 2012.

[7] Zheng Y T, Zhou F, Wu X L, et al. 23-Hydroxybetulinic acid from Pulsatilla chinensis (Bunge) Regel synergizes the antitumor activities of doxorubicin in vitro and in vivo [J]. *J. Ethnopharmacol*, 2010, 128(3): 615–622.



[8] Chen W K, Lin Q, Chen L, et al. The saponin of Chinese drug Bai-Tou-Weng: IV. The structures of anemosides B4 and A3 [J]. *Acta Chim. Sin*, 1990, 48(5): 501–505.

[9] Park H J, Kwon S. H, Lee J H, et al. Kalopanax saponin A is a basic spaonin structure for the anti-tumor activity of hederagenin monodesmosides [J]. *Planta Med*, 2001, 67(2): 118–121.

[10] Lee K T, Sohn C, Park H J, et al. Essential moiety for antimutagenic and cytotoxic activity of hederagenin monodesmosides and bisdesmosides isolated from the stem bark of Kalopanax pictus [J]. *Planta Med*, 2000, 66(4): 329-332.

[11] Shu Z, Chen Z, Ding X J, Lu B Q, et al. Three New Triterpenoids from Pulsatilla chinensis (Bunge) Regel and Their Cytotoxic Activities [J]. *Heterocycles*, 2011, 83(10): 2365-2371.

[12] Zhuang X H, Geng B Q, Yong D G. Experimental studies on antitumor effects of Pulsatilla chinensis (Bunge) Regel [J]. *J. Pract. Oncol*, 1999, (14): 94-96.

[13] 蔡鹰, 张能方. 白头翁体内抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中草药, 1999, 30(12): 929-931.

[14]] Sun J, Liu B R, Hu W J, et al. In vitro Anticancer Activity of Aqueous Extracts and Ethanol Extracts of Fifteen Traditional Chinese Medicines on Human Digestive Tumor Cell Lines [J]. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*, 2007, 21(11): 1102–1104.

[15] Xu Q M, Shu Z, Yang S L, et al. Antitumor activity of Pulsatilla chinensis (Bunge) Regel saponins in human liver tumor 7402 cells in vitro and in vivo [J].

*Phytomedicine*, 2012, 19(3-4): 293- 300.

[16] Yan F L, Wang A X, Jia Z J. Pentacyclic triterpenoidsfrom Aster ageratoides var. pilosus [J]. *Pharmaize*, 2004, 59(11): 882-884.

[17] 开桂青. 乌苏烷和齐墩果烷型五环三萜的超分子配位色谱分析[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2008.

[18] 孙婧. 几种齐墩果烷型三萜皂苷的合成及其生物活性研究[D]. 西安: 西北大学, 2010.

[19] Yu K, Chen F, Li C. Absorption, Disposition, and Pharmacokinetics of Saponins from Chinese Medicinal Herbs: What Do We Know and What Do We Need to Know More [J]. *Current Drug Metabolism*, 2012, 13(5): 577-598.

[20] Güçlü- stünda, Mazza G. Saponins: properties, applications and processing [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2007, 47(3): 231-258.



[21] Barthomeuf C, Debiton E, Mshvildadze V, et al. In vitro activity of hederacolchisid A1 compared with other saponins from Hedera colchica against proliferation of humancarcinoma and melanoma cells [J]. *Planta Med*, 2002, 68(8): 672-675.

[22] Bang S C, Lee J H, Song G Y, et al. Antitumor activity of Pulsatilla koreana saponins and their structure–activity relationship [J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(11): 1451-1454.

[23] Song M, Hang T J, Wang Y, et al. Determination of oleanolic acid in human plasma and study of its pharmacokinetics in Chinese healthy male volunteers by HPLC tandem mass spectrometry [J]. *J pharm Biomed Anal*, 2006, 40(1): 190-196.

[24] Cheng X, Shin Y G, Levine B S, et al. Quantitative analysis of betulinic acid in mouse, rat and dog plasma using electrospray liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Rapid Communical Mass Spectromet*, 2003, 17(18): 2089-2092.

[25] Udeani G O, Zhao G M, Geun S Y, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid CD-1 mice [J]. *Biopharma Drug Disposit*, 1999, 20(8): 379-383.

[26] Liao Q F, Yang W, Jia Y, et al. LC-MS determination and pharmacokinetic studies of ursolic acid in rat plasma after administration of traditional Chinese medical preparation Lu-Ying extract [J]. *Yakugaku zasshi*, 2005, 125(6): 509-515.

[27] 冯亮, 蒋学华. 三七总皂苷在大鼠体内的药物动力学研究[J]. 华西药学杂志, 2010, 25(1): 046-049.

[28] Zhu H, Ding L, Shakya S, et al. Simultaneous determination of asperosaponin VI and its active metabolite hederagenin in rat plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with positive/negative ion-switching electrospray ionization and its application in pharmacokinetic study [J]. *Chromatogr. B*, 2011, 879(30): 3407-3414.

[29] Zheng Y F, Qi L W, Zhou J L, et al. Structural characterization and identification of oleanane-type triterpene saponins in Glycyrrhiza uralensis Fischer by rapid-resolution liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 2010, 24(22): 3261-3270.

[30] Qiao X, Zhang X, Ye M, et al. Rapid characterization of triterpene saponins from Conyza blinii by liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 2010, 24(22): 3340-3350.



[31] Liu H F, Yang J, Du F, et al. Absorption and disposition of ginsenosides after oral administration of Panax notoginseng extract to rats [J]. *Drug Metab. Dispos*, 2009, 37(12): 2290-2298.

[32] 刘史佳, 居文政. 柴胡皂苷a 的药代动力学及药物相互作用研究[D]. 江苏: 南京中医药大学, 2007.

[33] Jeong D W, Kim Y H, Kim H H, et al. Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats [J]. *Bio-phamra Drug Dispos*, 2007, 28(2): 51-57.

[34] Gu Y, Wang G J. Pharmacokinetic characterization of ginsenoside Rh2, an anticancer nutrient from ginseng in rats and dogs [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(9): 2257-2268.

[35] 陈振华, 管咏梅, 张妮, 等. 白头翁总皂苷在大鼠肠外翻试验中吸收特性考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18): 30-33.

[36] Imai T, Sakai M, Ohtake H, et al. Absorption-enhancing effect of glycyrrhizin induced in the presence of capric acid [J]. *Int J Pharm*, 2005, 294(1-2): 11-21.

[37] 陈晓燕, 狄留庆, 赵晓莉. 通塞脉微丸活性成分的大鼠在体肠吸收研究[J]. 南京中医药大学学报, 2007, 23(4): 231-233.

[38] 刘智宇, 江蔚新, 吴斌. 皂苷类成分吸收分布和代谢及排泄研究进展[J]. 中国现代药物应用, 2012, 21(12): 127-130.

[39] Feng L, Wang L, Hu C, et al. Pharmacokinetics, Tissue Distri-bution, Metabolism, and

Excretion of Ginsenoside Rg1 in Rats [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2010, 33(12): 1975-1984.

[40] Paek I B, Moon Y, Kim J, et al. Pharmacokinetics of a GinsengSaponin Metabolite Compound K in Rats [J]. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 2006, 27(1): 39-45.

[41] Zhang W D, Zhang C, Liu R H, et al, Quantitative determination of Astragaloside IV, a natural product with cardioprotective activi-ty, in plasma, urine and other biological samples by HPLC cou-pled with tandem mass spectrometry [J]. *Journal Chromatography B*, 2005, 822(1-2): 170-177.

[42] 谭欣玮. 羟基积雪草苷在SD大鼠体内的药代动力学研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2010.

[43] Han M, Sha X, Wu Y, et al. Oral absorption of ginsenoside Rb1 using in vitro and in vivo models [J]. *Planta Medica*, 2006, 72(5): 398-404.

[44] Hattori M, Sakamoto T, Kobashi K, et al. Metabolism of glycyrrhizin by human intestinal flora [J]. *Planta Med*, 1983, 48(1): 38-42.

[45] 于林芳, 徐杰, 陈士国, 等. 仿刺参皂苷类化合物的电喷雾负离子质谱裂解规律研究[J]. 质谱学报, 2011, 32(2): 77-81.

[46] Liu S Y, Cui M\*, Liu Z Y, et al. Structural Analysis of Saponins from Medicinal Herbs Using Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2004, 15(2): 133-141.

[47] Tobias Madl, Heinz Sterk, and Martin Mittelbach. Tandem Mass Spectrometric Analysisof a Complex Triterpene Saponin Mixture of Chenopodium quinoa [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2006, 17(6): 795–806.

[48] Li M, Hou X F, Zhang J, et al. Applications of HPLC/MS in the analysis of traditional Chinese medicines [J]. *J Pharm Anal*, 2011, 4(2): 81-91.

[49] 张文婷. 虎杖质量控制方法及相关成分药物代谢动力学研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2009.

[50] 滕燕妮. 莫吉斯坦药代动力学及体内代谢研究[D]. 济南: 山东大学, 2012. [51] Ha Y W, Na Y C, Ha I J, et al. Liquid chromatography/mass spectrometry-basedstructural analysis of new platycoside metabolitestransformed by human intestinal bacteria [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(1): 202-209.

[52] Zhang J, Cheng Z H, Yu B Y, et al. Novel biotransformation of pentacyclictriterpenoid acids by Nocardia sp. NRRL-5646 [J]. *Tetrahedron Lett*, 2005, 46(13): 2337-2340. [53] Kim D H, Jang L S, Lee S W. Bacteroides J-37, a human intestinal bacterium, produces alpha-glucuronidase [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1997, 20(8): 834-837.

[54] e J, Lee E, Kim D, et al. Studies on absorption, distributionand metabolism of ginseng in humans after oral administration [J]. *J Ethnopharmcol, 2009*, 122(1): 143.

[55] egawa H, Suzuki R, Nagaoka T. Prevention of growth and metastasis of murine melanoma through enhanced natural-killer cytotoxicity by fatty acid-conjugate of protopanaxatiol [J]. *J. Biol. Pharm. Bull*, 2002, 25(7): 861-866.

[56] Cai Z W, Qian T X, Wong R N S, et al. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for metabolism and pharmacokinetic studies of ginsenoside Rg3 [J]. *Anal Chim Acta*, 2003, 492(1-2): 283.



[57] Sharma S, Sharma OP, Singh B, et al. Biotransformation of lantadenes, the pentacyclic triterpenoid hepatotoxins of lantana plant, in guinea pig [J]. *Taxicon*, 2000, 38(9): 1191-1202.

[58] Sharma S, Sharma OP, Dawra RK, et al. Disposition of lantadene A, the pentacyclic triterpenoid hepatotoxin, orally administration to guinea pig [J]. *Toxicol Lett*, 1999, 105(1): 59-66.

[59] Hu J, Reddy M B, Hendrich S, et al. Soyasponin I and Sapong B have limited absorption by Caco-2 intestinal cells and limited bioavail-ability in women [J]. *J Nutrit*, 2004, 134(8): 1869-1873.

[60] 张东明, 宫濑敏, 野口博司, 等. 黄花倒睡莲皂苷Reinioside C在大鼠体内代谢产物的鉴定[J]. 高等学校化学学报, 2002, 23(1): 63-67.

[61] Komoto N, Ichikawa M. Murine metaolism and absorption of lancemaside A, an active compound in the roots of Codonopsis lanceolata [J]. *J Nat Med*, 2010, 64(3): 321-329.

[62] Takeda S, Iathara K, Wakui Y, et al. Bioavibility study of glycyrrhetic acid after oral administration of glycyrrhizin in rats: relevance to the intestinal bacterial hydrolysis [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1996, 48(9): 902-905.

[63] Liu H F, Yang J L, Du F F. Absorption and disposition of ginsenosides after oral administration of Panaxnoginseng extract to rats [J]. *Drug Merab Dispos*, 2009, 37(12): 2290-2298.

[64] Zhang J, Cheng Z H, Yu B Y, et al. Novel biotranaformation of pentacyclic triterpenoid acids by Nocardia sp. NRRL-5646 [J]. *Tetrahedron Lett*, 2005, 46(13): 2337-2340.

[65] Xin X, Liu Y, Ye M, et al. Micrebial transformation of glycymbetinic acid by Mucor polymorphosporus [J]. *Planta Med*, 2006, 72(2): 156-161.

[66] Kim D H, Lee S W, Han M J. Biotransormation of glycyrrhizin to 18 beta-glycyrrhetinic acid-3-O-beta-D-glucuronide by Streptococcus LJ-22, a human intestinal bacterium [J]. *Biol Pharm Bull*, 1999, 22(3): 320-322.

[67] 田莉, 高晓黎. 复方甘草酸苷片的研制与体外代谢研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2008.

[68]高凯, 余伟. 大鼠肝微粒体CYP3A1/2和CYP2C9/10参与甘草次酸羟化代谢[J]. 中国临床药理学杂志, 2007, 12(11): 1255-1260.



[69] Liu L, Xiao J. In vitro metabolism of glycyrrhetic acid by human cytochrome P450 [J]. *Acta Pharm Sin*, 2011, 46(1): 81-87.

[70] Chatterjee P, Kouzi S A. Biotranaformation of the antimelanoma ATCC 13368 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 3850-3588.

[71] Choudhary M I, Batool I, Khan S N, et al. Microbial transformantion of alranolic acid by Fussrium lini and alpha-glucosidase inhibitory activity of its transformed products [J]. *Nat Prod Res*, 2008, 22(20): 489-494.

[72] Young W H. Liquid chromatography/mass spectrometrybased structural analysis of new platycoside metabolites transformed by human intestinal bacteria [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(1): 202-209.

[73] 严梅桢. 人肠道菌对柴胡皂苷的代谢[J]. 国外医学: 中医中药分册, 2001, 23(3): 156-158.

[74] 余伯阳, 张剑. 五环三萜生物转化研究概述[J]. 中国天然药物, 2007, 5(6): 457-462.

[75] 张剑, 程志红, 余伯阳. *Nocardia* sp NRRL-5646对三种五环三萜皂苷元代谢的研究[J]. 中国天然药物, 2004, 2(6): 3762-3781.

[76] 梁文权, 李高, 刘建平. 生物药剂学与药物动力学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.

[77] 韦凤华, 宋林, 何毅, 等. 人参皂苷Rg1在大鼠体内的代谢与排泄研究[J].

华西药学杂志, 2010, 25(3): 302-305.

[78] 杨秀伟, 桂方晋, 田建明, 等. 人参皂苷-Rg2在大鼠体内的药代动力学[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(7): 967-970.

[79] 邴飞虹, 易艳东, 张国斌. 蜈蚣三七有效成分W3单次给药后在小鼠体内的药代动力学[J]. 中国药科大学学报, 2006, 37(6): 523-526.

[80] Egan W J, Jauric G. Prediction of intestinal permeability [J]. *Adv Drug Rev*, 2002, 54(3): 273-289.

[81] Han M, Sha X, Wu Y, et al. Oral absorption of ginsenoside Rb1 using in vitro and in vivo models [J]. *Planta Med*, 2006, 72(5): 398-404.



## 第二章 白头翁皂苷的化学成分及其含量测定研究

为了顺利完成后期动物实验和体外肠道代谢研究，我们采用制备色谱、动态轴向色谱、HPLC-ELSD、UHPLC-MS对5种将要研究的白头翁皂苷进行了分离纯化和鉴定。

## 2.1 仪器与材料

### 2.1.1 仪器

Agilent 1100高效液相色谱仪，配以四元泵(G1311)，在线脱气机(G1322)，柱温箱(G1316C)，美国Alltech ELSD 2000蒸发光散射检测器，Agilent 1100化学工作站；配以色谱柱ODS COSMOSIL C18 (5µm, 250 mm×4.6 mm)。

美国Waters 515高效液相色谱仪，配以二元泵(1525)，在线脱气机(1322)，柱温箱(1500)，Waters 2996 PDA检测器，Echrom 98色谱工作站；配以色谱柱COSMOSIL Packed Column 5 C18-MS-Ⅱ101D×250mm 。



Agilent 1290快速分离液相色谱（RRLC）偶联三重四级杆LC/MS（Agilent QQQ 6460），电喷雾离子源(ESI). RPLC配备二元泵(G4220A)，自动恒温柱温箱(G1316C)，自动进样器(G4226A)，自动恒温器(G1330B) 和紫外检测器

(DAD, G4212A)。

UNITY INOVA 500核磁共振仪（美国瓦里安公司，TMS内标）。

IKA涡旋仪；KQ 3200E型超声波仪；岛津十万分之一天平（AUW2200型电子分析天平）。

### 2.1.2 药材

干燥的白头翁根购买自辽宁省绥中市，由苏州大学药学院李笑然教授鉴定。药材标本(No. 08-02-15-18)存放在苏州大学药学院中药标本馆。

## 2.2 色谱条件

### 2.2.1 **HPLC-ELSD**条件

流动相A为甲醇，B 为水，梯度洗脱，程序为0～30 min, A (75%～90%)；流

速1.0 mL·min-1；柱温25℃；蒸发光散射检测器漂移管温度为75℃，气体流速为2.0 L·min-1；进样体积20µL 。

### 2.2.2 制备色谱条件

流动相A为甲醇，B 为水；等度洗脱，A 80%；流速5 mL·min-1，检测波长206

Nm 。

### 2.2.3 **LC-MS**条件

采用Phenomenex®Kinetex C18色谱柱(1.7µm, 50×2.1 mm, Phenomenex Torrance, CA, USA)和Phenomenex®SecurityGuard ULTRA Cartridges保护预柱（4.6 mm id, Phenomenex, Torrance, CA, USA)。

柱温30℃，进样量2µL。



流动相（流速0.2 mL·min-1）由溶剂A（甲醇）和溶剂B (2 mmol·L醋酸铵水溶液)组成。

ESI质谱源：干燥氮气流速，10 L·min-1；干燥气体温度，350℃；喷雾器压力，50 psi；毛细管电压，-4000 V。

各待测成分的MRM通道参数：B3 *m/z* 911.4→603.2, BD *m/z* 749.4→471.3, B7 和

B10 *m/z* 895.6→733.2, B11 *m/z* 733.5→455.3.

## 2.3 分离提取与鉴定

### 2.3.1 提取与分离

干燥的白头翁药材（20 kg），10倍量70%乙醇回流提取3次，得白头翁总皂苷

（Extract 1）。将白头翁总皂苷用1.0% NaOH水溶液碱水解反应6小时后，放冷过夜，用盐酸调节pH至7.0，上D101大孔树脂柱，依次用水、40 %乙醇、75 %乙醇、95%乙醇洗脱；收集75 %乙醇洗脱液，减压浓缩，真空干燥即得总皂苷碱水解产物57g (Extract 2)，为抗肿瘤药理活性部位；将Extract 2经制备色谱用甲醇和水梯度分离，获得白头翁皂苷B3 (70 mg), BD (50 mg), B7 (70mg), B10 (50mg)和B11 (40 mg)。

见Fig.2- 1.



Dried roots of *Pulsatilla chinenais* (Bunge.) Regel (20 kg)

Extracts 1

Extracted with EtOH-H2O in D101

(0:100) 10L



C

Extract 2 (57g)

Partly Purified with MeOH-H2O on Preparation Chromatograph

(95:5)

B3

(70mg)

Fig. 2- 1 Extraction of PRS from the Dried roots of*Pulsatilla chinenais* (Buge) Regel

### 2.3.2 结构鉴定

化合物1：白色粉末，ESI-MS *m/z*: 935 [M+Na] +; Liebermann-Burchard 反应阳性，

Molish反应阳性；1H-NMR (500 MHz, C5D5N)δ: 1.01, 1.01, 1.08, 1.10, 1.17, 1.31 (each 3H, s, CH3), 1.73 (3H, m, H-6 of rha), 5.06 (1H, d, *J* =8.0 Hz, H-1 of glc), 5.19 (1H, d,

*J*=6.0 Hz, H-1 of ara); 13C-NMR (125 MHz, C5D5N), 5.54 (1H, s, H-12), 6.33 (1H, s, H-1 of

rha);数据见Table2-1 和Table2-2**,** 以上数据与文献[1, 2, 3]报道的3-O-β-D-吡喃葡萄糖基

-(1→4) -[α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)]-α-L-吡喃阿拉伯糖数据基本一致，因此可以确定化合物为常春藤皂苷元3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4) -[α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)]-α-L-吡喃阿拉伯糖（白头翁皂苷B3）。结构见Fig.2- 2。

**HO**



**OH**

**HO**   **O** **O**

**OH**   **O**

**OH**

**O**

**O**

**HO**

**O** **OH**

**O**

**HO**

**OH**

**OH**

Fig. 2- 2 Chemical structures of PRS B3

化合物2：白色粉末，ESI-MS *m/z*: 773 [M+Na] +; Liebermann-Burchard 反应阳性，

Molish反应阳性；1H-NMR (500 MHz, C5D5N)δ: 1.01, 1.02, 1.08, 1.10, 1.14, 1.31 (each 3H, s, CH3), 1.72 (3H, m, H-6 of rha), 5.19 (1H, d, *J* =6.0 Hz, H-1 of ara), 5.54 (1H, s, H-12), 6.32 (1H, s, H-1 of rha); 13C-NMR (125 MHz, C5D5N) 数据见Table2-1 和



Table2-2，以上数据与文献[4, 5, 6]报道的3-O-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2) -α-L-吡喃阿拉伯糖数据基本一致，因此可以确定化合物2 为常春藤皂苷元3-O-α-L-吡喃鼠李糖基

-(1→2) -α-L-吡喃阿拉伯糖（白头翁皂苷BD）。结构式见Fig.2- 3。

**O**

**HO** **OH**

**O**

**O**

**HO**

**O** **OH**

**O**

**HO**

**OH**

**OH**

Fig. 2- 3 Chemical structures of PRS BD

化合物3：白色粉末，ESI-MS *m/z*: 919 [M+Na] +; Liebermann-Burchard 反应阳性，

Molish反应阳性；1H-NMR (500 MHz, C5D5N)δ: 0.93, 1.04, 1.07, 1.10, 1.18, 1.26, 1.38 (each 3H, s, CH3), 1.72 (3H, d, *J*=6.0 Hz, H-6 of rha), 4.85 (1H, d, *J*=5.5 Hz, H-1 of ara),

5.21 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-1 of glc), 5.55 (1H, s, H-12), 6.23 (1H, s, H-1 of rha); 13C-NMR

（125 MHz, C5D5N）数据见Table2-1和Table2-2**,** 以上数据与文献[11,4]报道的3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4) -[α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)]-α-L-吡喃阿拉伯糖数据基本一致，因此可以确定化合物3为齐墩果酸3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→4) -[α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)]-α-L-吡喃阿拉伯糖（白头翁皂苷B7）。结构式见Fig.2- 4。

**HO**

**O**

**OH**

**HO**   **O**



**OH**   **O**

**OH**

**O**

**O**

**HO**

**O**

**O**

**HO**

**OH OH**

Fig. 2- 4 Chemical structures of PRS B7

化合物4：白色粉末，ESI-MS *m/z*: 919 [M+Na] +; Liebermann-Burchard 反应阳性，

Molish反应阳性；1H-NMR (500 MHz, C5D5N)δ: 0.92, 1.04, 1.06, 1.09, 1.21, 1.39, 1.41 (each 3H, s, CH3), 1.63 (3H, d, *J*=6.0 Hz, H-6 of rha), 4.90 (1H, d, *J*=6.5 Hz, H-1 of ara),

5.54 (1H, s, H-12), 5.55 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-1 of glc), 6.25 (1H, brs, H-1 of rha);

13C-NMR (125 MHz, C5D5N)数据见Table2-1 和Table2-2**,** 以上数据与文献[7, 8]报道的

3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→3) -[α-L-吡喃鼠李糖基] -(1→2) -α-L-吡喃阿拉伯糖数据基本一致，因此可确定化合物4为齐墩果酸3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→3) -[α-L-吡喃鼠李糖基] -(1→2) -α-L-吡喃阿拉伯糖（白头翁皂苷B10）。结构式见Fig.2- 5。

**O**

**HO** **OH**

**HO**

**HO**   **O** **O**

**O**

**OH**   **O** **O**

**OH**  **HO**

**O**

**OH OH**

Fig. 2- 5 Chemical structures of PRS B10

化合物5：白色粉末，ESI-MS *m/z*: 757 [M+Na] +; Liebermann-Burchard和Molish反应阳性；1H-NMR (500 MHz, C5D5N)δ: 0.93, 1.04, 1.08, 1.10, 1.15, 1.26, 1.39 (each 3H, s, CH3), 1.71 (3H, d, *J*=6.0 Hz, H-6 of rha), 4.99 (1H, d, *J*=6.5 Hz, H-1 of ara), 5.55 (1H, s, H-12), 6.25 (1H, s, H-1 of rha); 13C-NMR (125 MHz, C5D5N)数据见Table2- 1和Table2- 2**,**



**O**

**HO**

**OH**

**O**

**HO**

**O**

**O**

**O**

**HO**

**OH**

**OH**

Fig.2- 6 Chemical structures of PRS B11

Table2- 1 13C-NMR Spectral data for the Aglycon Moieties of compounds B3,BD,B7,B10,B11 (125 MHz, C5D5N, *δ*)

以上数据与文献[1, 9]报道的3-O-*α*-L-吡喃鼠李糖基-(1→2) -*α*-L-吡喃阿拉伯糖数据基本一致，因此可以确定化合物为齐墩果酸3-O-*α*-L-吡喃鼠李糖基-(1→2) -*α*-L-吡喃阿拉伯糖（白头翁皂苷B11）。结构式见Fig.2- 6。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Carbon** | **B3** | **BD** | **B7** | **B10** | **B11** |
| **1** | 39.13 | 39.08 | 39.02 | 39.02 | 38.99 |
| **2** | 26.44 | 26.31 | 26.75 | 26.78 | 26.63 |
| **3** | 81.18 | 81.16 | 88.85 | 88.87 | 88.89 |
| **4** | 43.64 | 43.62 | 39.64 | 39.73 | 39.61 |
| **5** | 47.93 | 47.85 | 56.14 | 56.13 | 56.04 |
| **6** | 18.27 | 18.25 | 18.65 | 18.63 | 18.65 |
| **7** | 33.01 | 32.97 | 33.44 | 33.42 | 33.41 |
| **8** | 39.89 | 39.86 | 39.88 | 39.88 | 39.86 |
| **9** | 48.30 | 48.27 | 48.19 | 48.18 | 48.17 |
| **10** | 37.03 | 37.00 | 37.18 | 37.18 | 37.16 |
| **11** | 23.92 | 23.94 | 23.93 | 23.92 | 23.91 |



Table2- 2 13C-NMR Spectral data for the Sugar Moieties of compounds B3,BD,B7,B10,B11 (125 MHz, C5D5N, δ)

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **12** | 122.72 | 122.68 | 122.69 | 122.66 | 122.60 |
| **13** | 145.03 | 144.97 | 145.00 | 144.97 | 145.00 |
| **14** | 42.29 | 42.26 | 42.31 | 42.30 | 42.30 |
| **15** | 28.50 | 28.47 | 28.48 | 28.46 | 28.21 |
| **16** | 23.92 | 23.88 | 23.93 | 23.92 | 23.91 |
| **17** | 46.80 | 46.76 | 46.82 | 46.81 | 46.65 |
| **18** | 42.10 | 42.09 | 42.14 | 42.14 | 42.16 |
| **19** | 46.57 | 46.54 | 46.64 | 46.62 | 46.65 |
| **20** | 31.08 | 31.05 | 31.11 | 31.10 | 31.10 |
| **21** | 34.36 | 34.34 | 34.4 | 34.39 | 34.39 |
| **22** | 33.29 | 33.35 | 33.44 | 33.31 | 33.30 |
| **23** | 64.04 | 64.09 | 28.21 | 28.33 | 28.21 |
| **24** | 14.17 | 14.09 | 17.17 | 17.29 | 17.12 |
| **25** | 16.21 | 16.17 | 15.69 | 15.67 | 15.64 |
| **26** | 17.59 | 17.56 | 17.53 | 17.52 | 17.52 |
| **27** | 26.30 | 26.26 | 26.32 | 26.31 | 26.29 |
| **28** | 180.64 | 180.45 | 180.42 | 180.44 | 180.45 |
| **29** | 33.39 | 33.35 | 33.44 | 33.42 | 33.41 |
| **30** | 23.92 | 23.8 | 23.93 | 23.92 | 23.91 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Carbon** | **B3** | **BD** | **Carbon** | **B7** | **Carbon** | **B10** | **B11** |
| **C3-O-** | \_ | \_ | **C3-O-** | \_ | **C3-O-** | \_ | \_ |
| **Ara- 1** | 104.54 | 104.49 | **Ara- 1** | 105.09 | **Ara- 1** | 105.53 | 104.97 |
| **2** | 76.42 | 75.93 | **2** | 76.53 | **2** | 76.08 | 76.06 |
| **3** | 75.15 | 74.84 | **3** | 74.20 | **3** | 74.58 | 73.94 |
| **4** | 80.56 | 69.45 | **4** | 79.74 | **4** | 69.91 | 68.80 |
| **5** | 65.53 | 65.80 | **5** | 64.64 | **5** | 65.88 | 64.82 |
| **Rha- 1** | 101.82 | 101.78 | **Rha- 1** | 101.93 | **Rha- 1** | 101.81 | 101.88 |
| **2** | 72.41 | 72.48 | **2** | 72.44 | **2** | 71.63 | 72.54 |
| **3** | 72.59 | 72.66 | **3** | 72.63 | **3** | 83.45 | 72.72 |
| **4** | 74.27 | 74.25 | **4** | 74.2 | **4** | 73.15 | 74.2 |
| **5** | 69.78 | 69.80 | **5** | 69.96 | **5** | 69.46 | 70.00 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **6** | 18.76 | 18.65 | **6** | 18.78 | **6** | 18.63 | 18.69 |
| **Glc- 1** | 106.89 | \_ | **Glc- 1** | \_ | **Glc- 1** | 106.96 | \_ |
| **2** | 75.62 | \_ | **2** | \_ | **2** | 75.93 | \_ |
| **3** | 78.93 | \_ | **3** | \_ | **3** | 78.73 | \_ |
| **4** | 71.37 | \_ | **4** | \_ | **4** | 71.84 | \_ |
| **5** | 78.69 | \_ | **5** | \_ | **5** | 78.62 | \_ |
| **6** | 62.64 | \_ | **6** | \_ | **6** | 62.63 | \_ |

其13C-NMR图谱如Fig.2- 7, 1H-NMR图谱如Fig.2- 8:





Fig. 2- 7 The13C-NMR Spectrum of the analytes (125 MHz, C5D5N)





Fig. 2- 8 The1H-NMR Spectrum of the analytes (500 MHz, C5D5N)

## 2.4 白头翁总皂苷5种成分的含量测定

### 2.4.1 溶液制备

以甲醇为溶剂，取本次实验自白头翁分离所得的白头翁总皂苷(Extract 2)配制成0.5003 mg·mL-1溶液，微孔滤膜过滤，供分析测试用；精密称定本次实验获得5 个

单体成分溶解于甲醇中制成各自的贮备液，含量分别为617µg・mL-1, 510µg・mL-1, 819

µg·mL-1, 720µg·mL-1, 519µg·mL-1，过滤，供HPLC用。



### 2.4.2 含量测定

按照“本章HPLC-ELSD条件”，对本次提取制备的白头翁皂苷甲醇溶液进行测定，将其色谱图与对照品比较，标记B3, BD, B7, B10和B11色谱峰，并按HPLC峰面积归一化法计算其含量。

### 2.4.3 含量测定结果

##### (1) **HPLC-ELSD**和**UPLC-MS**检测

根据“本章HPLC-ELSD条件”和“LC-MS条件”，白头翁皂苷B3, BD, B7, B10,

B11单体的HPLC-ELSD和LC-MS的信息见Fig.2- 9，其纯度均> 98%。

ADC1 A, ADC1 CHANNEL A (LYL\BTW000007.D)

mAU

260

240

220

200

180

160

140

120

100

2 4 6 8 10 12 14 16 18 min

ADC1 A, ADC1 CHANNEL A (LYL\BTW000013.D)

mAU

220

0



200

180

160

140

120

100

mAU

220

200

180

160

140

120

2 4 6 8 10 12 14 16

ADC1 A, ADC1 CHANNEL A (LYL\BTW000019. D)

20.445

min

100

4.088

6.497

14.647

1188..446233

111999...655827213

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

0 2.5 5 7.5 10 12.5 15 17.5 20 min

mAU

ADC1 A, ADC1 CHANNEL A (LYL\BTW000024. D)

600

500

400

300

200

100

0 2.5 5 7.5 10 12.5 15 17.5 20 22.5

min

ADC1 A, ADC1 CHANNELA (LYL\BTW000032.D)

mAU

225

200

175

150

125

100

75

50

25

5 10 15 20 25

min

Fig. 2- 9 HPLC-ELSD (0.5mg·mL-1), MS and MS2 chromatography of five pulchinenosides

##### **(2)** 白头翁皂苷中各成分的含量测定

经HPLC-ELSD 测定，白头翁皂苷(Extract 2)其保留时间适中，分别为9.97 min,

13.316 min, 16.353 min, 19.028 min和19.910 min，各成分间的分离度较好，如Fig.2- 10.

mAU

160

140

120

100

80

60

40

20

0

ADC1 A, ADC1 CHANNEL A (LYL\20130812\用于论文的HPLC-ELSD文件\SAMPLE. D)

B3

B7

BD B10 B11

0 5 10 15 20 25

Fig. 2- 10 HPLC-ELSD chromatograms of five pulchinenosides

min



白头翁皂苷提取物中B3, BD, B7, B10 和B11 的含量分别为24.1%, 7.4%,

12.4%, 13.5%和8.5 %，占白头翁总皂苷(Extract 2) 65.9%。

## 2.5 讨论

本次提取分离得到的白头翁皂苷(Extract 2)具有抗肿瘤活性[10,11]，这在我们课题组前期的研究中已经阐明。所以后续实验采用具有明确药理活性的化学物质组(Extract 2)进行药代动力学研究，以期揭示其发挥疗效的作用机制。

在检测方法上，本实验最初采用HPLC-UV法白头翁皂苷进行分析测定，但无法实现各成分之间的有效分离。这是由于皂苷的吸收波长为203 nm，处于紫外吸收的末端，为分析造成了很大的难度[12]。Baishen Sun等曾利用蒸发光散射检测器对黑人参中19种人参皂苷的含量进行分析[13]。这为本实验提供了参考。实验证明用HPLC-ELSD能实现对白头翁皂苷的分析测定。



参考文献：

[1] 徐国均, 袁昌齐, 秦慧贞, 等. 中药白头翁的生药学鉴定研究(续). [J] 药学学报, 1958, 6 (5): 256.

[2] 张庆文, 叶文才, 车镇涛, 等. 朝鲜白头翁的三萜皂苷成分研究究[J]. 药学学报, 2000, 35(10): 756-759.

[3] 刘雅娟, 徐东铭. 中药白头翁的化学成分研究[D]. 吉林: 长春中医药大学, 2010.

[4] Mimaki Y, Kuroda M, Asano T, et al. Triterpene Saponins and Lignans from the Roots of Pulsatilla Chinensis and Their Cytoxic Activity against HL-60 Cells [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(9): 1279-1283.

[5] 石宝俊, 李茜, 张晓琦, 等. 中药白头翁地上部分的三萜皂苷成分[J]. 药学学报, 2007, 42(8): 862-866.

[6] Sun H, Wang Y, Zhang X Q, et al. Chemical constituents of Pulsatilla dahurica [J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2009, 45(5): 764-765.

[7] 吴振洁, 丁林生, 赵守训, 等. 中药白头翁的苷类成分[J]. 中国药科大学学报, 1991, 22(5): 265-269.

[8] 丁秀娟, 杨世林. 中药白头翁的化学成分研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2010.

[9] 付云明, 张忠敏, 陈虹. 朝鲜白头翁化学成分的研究[D]. 河北: 河北医科大学,

2007.

[10] 舒展. 中药白头翁化学成分研究(二) [D]. 苏州: 苏州大学, 2012.

[11] Shu Z, Chen Z, Ding X J, Lu B Q, et al. Three New Triterpenoids from Pulsatilla chinensis (Bunge) Regel and Their Cytotoxic Activities [J]. *Heterocycles*, 2011, 83(10): 2365-2371.

[12] 王冠. 人参花蕾中人参皂苷的分离纯化与生物转化[D]. 北京: 北京化工大学, 2010.

[13] Sun B S, Gu L J, Fang Z M, et al. Simultaneous quantification of 19 ginsenosides in black ginseng developed from Panax ginseng by HPLC-ELS [J]. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2009, 50(1): 15-22.



## 第三章 白头翁皂苷在大鼠血浆中的药物动力学与绝对Th物利用度研究

临床前药代动力学研究的目的是揭示药物在动物体内的动态变化规律，阐明药物在动物体内的吸收、分布、代谢和排泄等过程的动力学特征，并且根据房室模型或非房室模型提供药物在体内的动力学参数，为药理学、药效学、毒理学及临床合理用药提供有价值的参考资料。

## 3.1 仪器与材料

### 3.1.1 仪器



Agilent 1290 快速分离液相色谱 (RRLC) 偶联三重四级杆 LC-MS (Agilent

QQQ6460) 电喷雾离子源 (ESI). RRLC 配备二元泵 (G4220A)，自动恒温柱温箱(G1316C) ， 自动进样器 (G4226A) ， 自动恒温器 (G1330B) 和紫外检测器

(DAD, G4212A). 色谱柱 Phenomenex ® Kinetex C18 column (1.7 µm, 50 × 2.1 mm, Phenomenex Torrance, CA, USA), 配备 Phenomenex ® Security Guard ULTRA

Cartridges保护预柱(4.6 mm id, Phenomenex, Torrance, CA, USA)。

微量移液枪（上海大龙医疗设备有限公司）；SPE 固相微萃取小柱(Agela Cleanert ODS C18,200mg/3mL)；DT5-3 型低速台式自动平衡离心机（北京时代北利离心有限公司）；IKA 涡旋仪；KQ3200E 型超声波仪；岛津十万分之一天平（AUW2200 型电子分析天平）。

### 3.1.2 药品与试剂

白头翁皂苷制备和含量测定见《白头翁总皂苷的化学成分及其含量测定研究》部分，5种皂苷的标准品(B3, BD, B7, B10和B11)（纯度> 98%）制备同样见《白头翁总皂苷的化学成分及其含量测定研究》部分。

常春藤皂苷元和内标物质(IS)连翘苷（纯度> 98%）购买自中国药品生物制品鉴定所（中国，北京），二者的化学结构见Fig.3- 1。

**O**

**O**

**OH**

**OH**

**O**

**CH3O**

**H3CO** **OCH3**

**CH2OH**

**O**

**HO**

**OH**

**O**

**HO**

**OH**

Fig. 3- 1 Chemical structures of hederagenin and forsythin(IS)

甲醇（HPLC级）购于Fisher Scientific (Fairlawn, NF, USA),醋酸铵（纯度> 99%）购于Sigma-Aldrich Co. Ltd (St Louis, MO, USA). 其他试剂均为分析纯。去离子水由Milli-Q超纯水设备制备。



### 3.1.3 实验动物

雄性无菌Wistar大鼠(*n*=12, 200～220 g)由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供（中国长沙）。实验前3 天饲养于昼夜自然循环的控制环境中[22±2℃，RH （50

±20）%]。动物实验遵循中华人民共和国国家科学技术委员会实验动物管理条例。

### 3.1.4 白头翁总皂苷提取物和白头翁皂苷钠盐的制备

白头翁皂苷均匀分散混悬液制备如下：取一定量白头翁总皂苷溶解在含0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)的水溶液中得口服用18.75 mg·mL-1均匀分散混悬液。

注射用白头翁皂苷钠盐溶液制备如下：称取一定量白头翁总皂苷粉末溶解于水中得18.75 mg·mL-1的溶液。缓慢加入氢氧化钠饱和溶液，同时搅拌直到pH 8.5，超声20～30 min 使其充分溶解。

### 3.1.5 血浆样品的采集

12 只大鼠随机分为2 组(n =6/组) 分别进行口服和静脉注射实验。禁食12 h

后，6 只大鼠给予白头翁总皂苷300 mg·kg-1，另6只大鼠尾静脉注射白头翁总皂苷

钠盐0.15 mg·kg-1. 给药前(0 min)和给药后0.033 (IV only), 0.083, 0.25, 0.5, 0.75

( PO only), 1.0,2.0 (IV only), 3.0 (PO only), 4.0 (IV only), 5.0 (PO only), 6.0 (IV only),

8.0 (PO only), 12.0 (PO only)和24.0 h (PO only)眼眶静脉取血150µL，血浆样品置于涂

有肝素的EP管中，4,000 r离心5 min. 分离的血浆样品置于-20°C环境中备用。药动学参数采用非房室模型，在DAS 2.0 software (Chinese Pharmacological Society)上进行。

## 3.2 分析方法的建立与验证

### 3.2.1 标准溶液和血浆样品制备

#### 3.2.1.1 储备液和对照品溶液的制备

精密称定各标准品分别溶解于甲醇中制成各自的贮备液，B3为617µg・mL-1，BD为510µg・mL-1，B7为819µg・mL-1, B10为720µg・mL-1, B11为519µg・mL-1，内标物质为1.108µg・mL-1。临用前用甲醇按一定比例稀释为混合标准溶液，如Table3- 1.4℃保存。

Working solutions

Table 3- 1 Series of working solutions of five pulchinenosides



B3 BD B7 B10 B11

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| /(ng·mL-1) |  | | | | |
| 1 | 5.529 | 3.754 | 4.980 | 2.074 | 1.661 |
| 2 | 11.06 | 7.507 | 9.959 | 4.147 | 3.322 |
| 3 | 22.11 | 15.02 | 19.92 | 8.296 | 6.644 |
| 4 | 55.28 | 37.54 | 49.80 | 20.74 | 16.61 |
| 5 | 138.21 | 93.84 | 124.49 | 51.84 | 41.52 |
| 6 | 276.42 | 187.68 | 248.98 | 103.68 | 83.04 |
| 7 | 691.04 | 469.20 | 622.44 | 259.20 | 207.60 |

#### 3.2.1.2 质控样品的制备

质控样品(QC)样品采用同样方法配制成含B3 (7.368,27.64,621.94 ng·mL-1), BD (5.005,37.54,422.28ng·mL-1), B7 (6.646,49.80,560.20ng·mL-1), B10 (2.758,20.74,2 33.28ng·mL-1), B11 (2.224,16.61,186.84 ng·mL-1)的系列溶液。

#### 3.2.1.3 内标溶液的制备

精密称取连翘苷对照品适量溶解于甲醇中，制成浓度为1.108 mg·mL-1的储备液，临用时用甲醇配成浓度为1.108µg・mL-1的内标溶液，储存于4℃，备用。

#### 3.2.1.4 血浆样品的预处理

50µL 大鼠血浆中加入20µL 内标溶液(1.108µg·mL-1)，加入10µL 60%甲醇水

溶液，然后加入70µL的60%甲醇水溶液。涡旋(30 s), 15,000 r超速离心10 min. 上清液转移至Phenomenex®Strata-X (60 mg/3 mL) cartridge (Macclesfield, UK) 的

SPE柱上，然后采用自动固相萃取仪(Bonna-Agela, Tianjing, China) 1 mL·min-1减压抽滤。

Strata-X ( polymeric reversed phase) SPE柱使用之前经2 mL甲醇和2 mL去离子水活化处理。样品洗脱时先用双蒸水(2 mL)淋洗SPE柱，再采用1 mL 90% (v/v)甲醇水溶液洗脱。洗脱液于45℃下N2吹干。固体残留采用100µL 90%甲醇水复溶，15,000 r离心10 min. 取所得样品2µL注入RRLC–MS/MS供分析。

### 3.2.2 分析方法的建立

#### 3.2.2.1 **LC-MS**条件



Phenomenex®Kinetex C18色谱柱(1.7µm, 50×2.1 mm, Phenomenex Torran ce, CA, USA) 。

Phenomenex®SecurityGuard ULTRA Cartridges保护预柱(4.6 mm id, Phenomen ex, Torrance, CA, USA) 。

柱温30℃，进样量2µL。

流动相（流速0.2 mL·min-1）由溶剂A，甲醇和溶剂B，2 mmol·L-1醋酸铵水溶液组成。洗脱条件如Table3- 2，运行时间为5 min。溶剂浓度很快恢复到初始浓度32%

B，同时自动进样器洗针时间为0.5 min。

Table 3- 2 Gradient condition

| time(min) | MeOH(A)% | 2Mmol.L-1 NH4OAc(B)% |
| --- | --- | --- |
| 0 | 68 | 32 |
| 1 | 80 | 20 |
| 2.5 | 82 | 18 |
| 4 | 85 | 15 |
| 4.5 | 85 | 15 |
| 5 | 95 | 5 |

ESI质谱源参数如下：干燥氮气流速，10 L·min-1；干燥气体温度，350℃；喷雾器压力，50 psi；毛细管电压，- 4000 V。氮气适用于所有情况。采用MRM模式进行定量分析。各待测成分的质谱参数，即碰撞电压(FV)和碰撞能量(CE)见Fig.3- 2。

各待测成分的MRM的停延时间为80 ms. 仪器控制、数据采集和分析在MassHunter workstation software (revision B.04.00)上进行。

各待测成分的MRM参数：B3 *m/z* 911.4→603.2，BD *m/z* 749.4→471.3，B7 和

B10 *m/z* 895.6→733.2，B11 *m/z* 733.5→455.3，连翘苷*m/z* 579.3→371.1。B3，BD，

B7，B10, B11和连翘苷的毛细管传输电压和碰撞能量分别为285, 250, 285, 290, 255

135 (V)和50, 52, 50, 57, 57, 20 (V). 如Fig.3- 2.



Fig. 3- 2 the MRM parameters for each analyte

#### 3.2.2.2 标准曲线的建立和最低定量限

50µL大鼠空白血浆中加入20µL内标溶液(1.108µg·mL-1)，加入10µL系列

浓度工作溶液，然后加入70µL的60%甲醇水溶液。其余按照“血浆样品的预处理和测定”中“涡旋(30 s)”至“取所得样品2µL注入RRLC-MS/MS供分析”同法操作。

记录白头翁皂苷B3, BD, B7, B10, B11与内标的峰面积，并计算5种待测成分与内标的峰面积比。分别以血浆中各待测成分的浓度为横坐标，各待测成分与内标物的峰面积比值为纵坐标，以加权最小二乘法(W=l/χ2)回归绘制标准曲线。标准曲线的绘制采用6个浓度水平，每个浓度平行3份，重复3天测定。

LLOQ为连续测定6 份的准确度在实际浓度的80%～120%之间，RSD小于

20%，信噪比大于5的浓度点，即为标准曲线上最低浓度点。

#### 3.2.2.3 精密度和准确度实验

50µL大鼠空白血浆中加入20µL内标溶液(1.108µg·mL-1)，加入高、中、低 3

个不同浓度的质控样品10µL，然后加入70µL的60%甲醇水溶液。其余按照“血浆样品的预处理和测定”中“涡旋(30s)”至“取所得样品2µL注入RRLC–MS/MS供分析”同法操作。每个浓度制备6 份，每个浓度连续进样6 次，测定日内精密度。

重复操作，连续测定3天并随行标准曲线，计算日间精密度。准确度通过样品的测定浓度与理论浓度的符合程度来评价，用相对回收率和相对误差来表示。

#### 3.2.2.4 提取回收率实验



50µL 大鼠空白血浆中加入20µL 内标溶液(1.108µg·mL-1)，加入10µL 质控溶液，然后加入70µL的60%甲醇水溶液。其余按照“血浆样品的预处理和测定”中“涡旋(30s)”至“取所得样品2µL注入RRLC-MS/MS供分析”同法操作。计算各待测化合物经提取后得到峰面积与未经提取直接进样获得的色谱峰面积的比值，计算提取回收率。内标物质同法测定。

#### 3.2.2.5 基质效应实验

取6个不同来源的大鼠空白血浆样品各50µL，加入70µL的60%甲醇水溶液。其余按照“血浆样品的预处理和测定”中“涡旋(30 s)”至“洗脱液于45℃ 下

N2吹干“同法操作。残渣中加入内标溶液20µL和质控溶液10µL，再加90%甲醇水至100µL复溶，15, 000 r离心10 min。取所得样品2µL注入RRLC–MS/MS供分析。分别记录5 个待测化合物和内标的峰面积，计算5 个待测化合物和内标的峰

面积比值(A1)。另精密吸取质控溶液10µL与内标溶液20µL混匀，加入蒸馏水50

µL，样品处理方法与上述样品相同，每浓度6份样品。取上清液2µL进样测定，

分别记录5个待测化合物和内标的峰面积，计算5个待测化合物和内标的峰面积比值(A2)。求各浓度下5个待测化合物的回收率(A1/A2×100%)，计算基质效应。

#### 3.2.2.6 稳定性实验

质控样品稳定性评价为待测物样品置于- 20°C 环境中1 月，循环冷冻(-20°C)

和溶解（室温）3次，以及室温24 h 放置的稳定性。

### 3.2.3 方法学验证结果分析

#### 3.2.3.1 方法专属性

在建立的LC-MS条件下，5 个白头翁皂苷和内标物质的MRM 检测具有较高选择性，色谱峰良好，内源性物质无干扰。典型色谱图见Fig.3- 3。连翘苷(IS)，B3，

BD，B7, B10和B11的保留时间分别为2.2, 2.6，3.3, 3.9和4.1 min。



**b**



**d**

Fig. 3- 3 Representative extract ion MRM chromatograms of forsythin(IS), five pulchinenosides and hederagenin:(a) blank plasma, (b) blank plasma spiked with the five analytes at LLOQ, hederagenin and

IS, (c) 0.75 h sample plasma after a single oral administration of PRS extract and (d) 0.083h sample plasma after a single intravenous administration of PRS extract sodium salt.

#### 3.2.3.2 线性范围和最低检测限

分析物质的线性范围、回归方程和相关系数见Table3- 3. 标准曲线范围满足血浆样品的浓度要求，5个分析样品在1.105-138.21 ng·mL-1 (B3), 0.7508-93.84 ng·mL-1 (BD), 0.9960-124.88 ng·mL-1 (B7), 0.4148-51.84 ng·mL-1 (B10), 0.3322-41.52 ng·mL-1

（B11）的范围内线性较好，*r2*> 0.99. B3，BD，B7, B10和B11的最低定量限分别为

1.105, 0.7508，0.9960, 0.4148和0.3322 ng·mL-1，变异系数分别为6.01%，1.78%，

1.22%, 1.39%和10.01%。

Table 3- 3 Regression data of the multi-components determined

| Components | Linear range (ng·mL-1) | Linear regression equation | Correlation coefficient (r2) |
| --- | --- | --- | --- |
| B3 | 1.105-138.21 | y=0.0531x-0.0044 | 0.9930 |
| BD | 0.7508-93.84 | y=0.154x+0.0531 | 0.9913 |
| B7 | 0.9960-124.88 | y=0.0928x-0.0101 | 0.9920 |
| B10 | 0.4148-51.84 | y=0.0743x+0.0063 | 0.9921 |
| B11 | 0.3322-41.52 | y=0.156x-0.0246 | 0.9912 |

#### 3.2.3.3 准确度和精密度

方法精密度和准确度如Table3- 4. 准确度为- 5.51% ~ 8.72%和2.32% ~ 13.66%，日间和日内精密度分别为- 5.61% ~ 10.78% 和1.47% ~ 10.73%。

Table 3- 4 Accuracies and precisions of B3, BD, B7, B10 and B11for RRLC–MS/MS method (*n*=6)



Spiked Intra-day Inter-day

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Components Accuracy  (ng·mL-1) concentration | | | | Precision Accuracy Precision | | | |
|  |  | (ng·mL-1) | (%) | (%, RSD) | (ng·mL-1) | (%) | (%, RSD) |
| B3 |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.474 | 1.570 | 6.54 | 3.41 | 1.590 | 7.90 | 5.75 |
|  | 5.528 | 6.010 | 8.72 | 4.31 | 6.080 | 9.99 | 3.66 |
|  | 124.39 | 120.04 | -3.50 | 6.25 | 117.98 | -5.15 | 5.34 |
| BD |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.001 | 0.970 | -3.10 | 2.43 | 0.9700 | -3.10 | 5.42 |
|  | 7.508 | 7.430 | -1.04 | 3.09 | 7.580 | 0.96 | 13.53 |
|  | 84.46 | 82.61 | -2.19 | 6.33 | 82.61 | -2.19 | 3.94 |
| B7 |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.329 | 1.382 | 3.97 | 2.81 | 1.340 | 0.81 | 13.66 |
|  | 9.960 | 10.45 | 4.92 | 6.96 | 10.65 | 6.93 | 12.98 |
|  | 112.04 | 105.87 | -5.51 | 2.95 | 105.75 | -5.61 | 11.13 |
| B10 |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 0.5516 | 0.5300 | -3.92 | 1.47 | 0.5500 | -0.29 | 3.76 |
|  | 4.148 | 4.356 | 5.02 | 4.44 | 4.375 | 5.48 | 2.83 |
|  | 46.66 | 48.71 | 4.40 | 10.73 | 51.21 | 9.76 | 6.75 |
| B11 |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 0.4448 | 0.4240 | -4.68 | 2.43 | 0.4200 | -5.58 | 2.32 |
|  | 3.322 | 3.533 | 6.35 | 5.18 | 3.680 | 10.78 | 4.59 |
|  | 37.37 | 34.75 | 1.20 | -7.00 | 38.45 | 1.30 | 2.90 |

Measured

Measured concentration

#### 3.2.3.4 提取回收率

如Table3- 5，白头翁皂苷B3、BD、B7、B10和B11的平均提取回收率为72.7% ~

93.1%, RSD≤8.3%. 内标物质的平均提取回收率为(81.9±2.4) %。

#### 3.2.3.5 基质效应

如Table3- 5，基质效应的均值为87.4% ~ 105.4%, RSD≤4.9%。表明在本方法的实验条件下，大鼠血浆中的内源性物质对5 个被测化合物的离子化无明显影响。

Table 3- 5 Extraction recoveries and matrix effects of B3, BD, B7, B10 and B11for RRLC–MS/MS method (*n*=6)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Recovery(%) | RSD(%) | Recovery(%) | RSD(%) |
| B3  1.474 | 74.72 | 2.2 | 97.16 | 1.9 |
| 5.528 | 73.54 | 2.9 | 87.35 | 3.5 |
| 124.39 | 82.47 | 4.6 | 90.57 | 0.9 |
| BD |  |  |  |  |
| 1.001 | 88.35 | 1.9 | 105.44 | 4.5 |
| 7.508 | 88.89 | 3.7 | 97.62 | 3.8 |
| 84.46 | 91.05 | 1.4 | 88.28 | 0.5 |
| B7 |  |  |  |  |
| 1.329 | 82.04 | 3.5 | 97.04 | 2.7 |
| 9.960 | 84.77 | 2.0 | 104.86 | 3.4 |
| 112.04 | 90.56 | 3.1 | 97.63 | 4.9 |
| B10 |  |  |  |  |
| 0.5516 | 84.88 | 4.0 | 95.47 | 2.1 |
| 4.148 | 89.79 | 4.5 | 98.59 | 3.0 |
| 46.66 | 93.15 | 8.3 | 99.83 | 0.3 |
| B11 |  |  |  |  |
| 0.4448 | 72.77 | 3.4 | 102.12 | 3.9 |
| 3.322 | 79.33 | 3.2 | 92.78 | 3.4 |
| 37.37 | 85.15 | 3.1 | 97.32 | 2.5 |

Components Spiked (ng·mL-1)

Extraction recovery Matrix effects

#### 3.2.3.6

稳定性

实验结果的稳定性如Table3- 6。表明血浆样品中的分析物质3 次冻融（RE: −10%

~ 13.8%, RSD≤7.4%)，室温静置24 h (RE: −11.0% ~ 14.5%, RSD≤3.6%), 1 个月内

在-20℃环境(RE: −4.9% ~ 14.7%, RSD≤6.7%)的条件下稳定。

Table 3- 6 Stability for analysis of B3, BD, B7, B10 and B11 in rat plasma (*n*=6)

Spiked Three freeze–thaw cycles 24 h at room temperature 30 days at -20°C

| (Ng·mL-1) Measured RSD RE | | | | | Measured | RSD | RE | Measured | RSD | RE |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Components |  | Concentration | (%) | (%) | Concentration | (%) | (%) | Concentration | (%) | (%) |
|  |  | (ng·mL-1) |  |  | (ng·mL-1) |  |  | (ng·mL-1) |  |  |
| B3 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.474 | 1.648 | 0.3 | 11.8 | 1.657 | 1.4 | 12.4 | 1.487 | 6.7 | 0.9 |
|  | 5.528 | 6.042 | 3.8 | 9.3 | 6.114 | 3.3 | 10.6 | 6.285 | 1.1 | 13.7 |
|  | 124.39 | 111.95 | 3.3 | -10.0 | 121.16 | 2.4 | -2.6 | 118.92 | 1.0 | -4.4 |
| BD |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.001 | 1.008 | 1.3 | 0.7 | 0.9750 | 0.9 | -2.6 | 0.9610 | 0.9 | -4.0 |
|  | 7.508 | 7.936 | 7.4 | 5.7 | 8.597 | 0.3 | 14.5 | 8.244 | 2.0 | 9.8 |
|  | 84.46 | 77.96 | 1.0 | -7.7 | 94.51 | 0.4 | 11.9 | 95.61 | 0.9 | 13.2 |
| B7 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.329 | 1.241 | 1.2 | -6.6 | 1.265 | 0.9 | -4.8 | 1.284 | 0.8 | -3.4 |
|  | 9.960 | 10.95 | 3.8 | 9.9 | 11.08 | 3.6 | 11.3 | 11.10 | 2.6 | 11.5 |
|  | 112.04 | 116.52 | 2.6 | 4.0 | 99.72 | 2.4 | -11.0 | 109.69 | 1.8 | -2.1 |
| B10 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 0.5516 | 0.5659 | 1.0 | 2.6 | 0.5819 | 0.5 | 5.5 | 0.5544 | 1.3 | 0.5 |
|  | 4.148 | 4.720 | 0.6 | 13.8 | 4.700 | 1.7 | 13.3 | 4.612 | 5.4 | 11.2 |
|  | 46.66 | 51.79 | 3.0 | 11.0 | 52.12 | 1.6 | 11.7 | 53.52 | 0.2 | 14.7 |
| B11 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 0.4448 | 0.4288 | 0.9 | -3.6 | 0.4199 | 1.4 | -5.6 | 0.4230 | 2.5 | -4.9 |
|  | 3.322 | 3.465 | 5.3 | 4.3 | 3.800 | 0.4 | 14.4 | 3.807 | 0.3 | 14.6 |
|  | 37.37 | 34.75 | 1.2 | -7.0 | 38.45 | 1.3 | 2.9 | 37.74 | 3.7 | 1.0 |

## 3.3 白头翁皂苷在大鼠血浆中的药物动力学和Th物利用度研究



### 3.3.1 血浆样品制备与测定

大鼠给药后，在不同时间点采集血浆，具体见“血浆样品的采集”，按照本章“血浆样品的预处理和制备”中所描述的制备和分析方法进行分析测定。



Time(h)

x

### 3.3.2 血药浓度数据

6只大鼠300 mg·kg-1白头翁皂苷提取物（相当于B3 72.22 mg·kg-1, BD 22.21 mg·kg-1, B7 37.29 mg·kg-1, B10 13.65 mg·kg-1, B11 8.47 mg·kg-1）口服给药后，血药浓度数据见Table3- 7；6只大鼠0.15 mg·kg-1白头翁提取物（相当于B3 36.11µg·kg-1, BD 11.11µg·kg-1, B7 18.64µg·kg-1, B10 6.82µg·kg-1, B11 4.24µg·kg-1）尾静脉给药后，血药浓度见Table3- 8. 平均血药浓度-时间曲线见Fig.3- 4.

Table 3- 7 Plasma concentrations of five pulchinenosides after single oral administration 300mg·kg-1 of PRS extract to six rats, respectively ( mean±S. D.)

(a, B3; b, BD; c, B7; d, B10; e, B11)

(a)

B3 (ng·mL-1)

| Time(h) | 1 | 2 | 3 |  | 4 | |  | 5 |  | 6 |  | x |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 0.083 | 48.37 | 15.57 | 102.66 |  | 113.54 | |  | 5.526 |  | 8.592 |  | 49.04 |
| 0.25 | 20.88 | 808.32 | 197.17 |  | 101.07 | |  | 10.30 |  | 12.99 |  | 191.79 |
| 0.5 | 288.54 | 64.4 | 471.52 |  | 109.95 | |  | 24.27 |  | 29.33 |  | 164.67 |
| 0.75 | 24.98 | 26.00 | 176.12 |  | 101.75 | |  | 2.759 |  | 18.48 |  | 58.35 |
| 1 | 9.237 | 16.43 | 125.08 |  | 35.77 | |  | 4.227 |  | 3.445 |  | 32.36 |
| 3 | 16.47 | 51.42 | 81.67 |  | 13.86 | |  | 3.052 |  | 3.015 |  | 28.25 |
| 5 | 10.41 | 77.61 | 38.19 |  | 12.48 | |  | 5.683 |  | 15.46 |  | 26.64 |
| 8 | 16.54 | 5.835 | 14.62 |  | 13.91 | |  | 5.976 |  | 21.87 |  | 13.12 |
| 12 | 15.44 | 21.5 | 23.54 |  | 12.48 | |  | 21.28 |  | 2.157 |  | 16.07 |
| 24 | 27.52 | 9.847 | 20.59 |  | 9.321 | |  | 11.9 |  | 2.059 |  | 13.54 |
| (b) |  |  |  |  |  | |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  | BD (ng·mL-1) | |  |  |  |  |  |  |
|  | 1 | 2 | 3 | | | 4 | | 5 | | 6 | |  |
| 0.083 | 6.251 | 3.914 | 13.58 | | | 43.04 | | 0.4001 | | 0.731 | | 11.32 |
| 0.25 | 2.524 | 72.85 | 10.95 | | | 12.11 | | 0.7593 | | 0.5592 | | 16.62 |
| 0.5 | 29.62 | 4.223 | 29.26 | | | 10.97 | | 3.032 | | 3.939 | | 13.51 |
| 0.75 | 4.755 | 6.147 | 15.3 | | | 12.31 | | 0.3533 | | 0.9213 | | 6.631 |
| 1 | 4.364 | 2.702 | 5.313 | | | 2.554 | | nd | | 0.0299 | | 2.992 |
| 3 | 2.982 | 4.142 | 4.808 | | | 0.525 | | nd | | nd | | 3.114 |
| 5 | 2.341 | 24.43 | 3.274 | | | 1.834 | | 0.9513 | | 1.581 | | 5.735 |



|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 8 | 3.224 | 0.9446 | nd | 6.799 | 0.2657 | 3.111 | 2.869 |
| 12 | 3.964 | 4.451 | 5.093 | 1.624 | 2.925 | nd | 3.612 |
| 24 | 4.956 | 3.111 | 3.149 | 3.247 | 1.822 | 1.343 | 2.938 |
| (c) |  |  |  |  |  |  |  |
| Time(h) | 1 | 2 | B7  3 | (ng·mL-1)  4 | 5 | 6 | x |
| 0.083 | 19.48 | 4.624 | 22.25 | 21.77 | 1.873 | 1.865 | 11.98 |
| 0.25 | 6.668 | 298.94 | 41.63 | 12.54 | 3.256 | 2.335 | 60.89 |
| 0.5 | 88.34 | 11.02 | 129.10 | 36.02 | 16.04 | 12.26 | 48.80 |
| 0.75 | 10.49 | 5.357 | 53.88 | 58.25 | 0.906 | 3.726 | 22.10 |
| 1 | 4.088 | 4.473 | 27.63 | 32.33 | 0.201 | 1.308 | 11.67 |
| 3 | 7.495 | 16.39 | 21.39 | 25.18 | 1.005 | 0.964 | 12.07 |
| 5 | 10.35 | 32.07 | 20.50 | 3.975 | 3.978 | 8.135 | 13.17 |
| 8 | 8.816 | 4.150 | 9.507 | 11.29 | 15.68 | 8.375 | 9.636 |
| 12 | 13.64 | 10.56 | 4.148 | 6.668 | 14.79 | 4.280 | 9.015 |
| 24 | 11.86 | 7.703 | 10.86 | 4.880 | 11.99 | 6.914 | 9.035 |
| (d) |  |  |  |  |  |  |  |
| B10 (ng·mL-1) | | | | | | | |
| Time(h) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | x |
| 0.083 | 6.972 | 2.073 | 11.22 | 11.55 | 0.7390 | 0.6547 | 5.536 |
| 0.25 | 3.575 | 129.91 | 51.05 | 5.178 | 0.6445 | 0.8595 | 31.87 |
| 0.5 | 36.75 | 6.918 | 57.36 | 20.32 | 7.645 | 5.347 | 22.39 |
| 0.75 | 4.828 | 2.830 | 22.58 | 39.66 | 0.6361 | 1.407 | 11.99 |
| 1 | 1.944 | 2.878 | 14.70 | 4.941 | 0.5849 | 1.017 | 4.344 |
| 3 | 3.463 | 9.701 | 10.10 | 10.92 | 0.9549 | 0.6356 | 5.964 |
| 5 | 3.466 | 9.680 | 7.679 | 5.960 | 3.301 | 4.393 | 5.747 |
| 8 | 4.350 | 4.187 | 4.760 | 5.721 | 2.372 | 2.288 | 3.946 |
| 12 | 4.245 | 3.968 | 1.980 | 2.356 | 4.522 | 1.694 | 3.127 |
| 24 | 4.975 | 3.044 | 6.607 | 5.219 | 5.800 | 2.934 | 4.763 |

(e)

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |  |
| 0.083 | 4.355 | 2.757 | 7.015 | 8.292 | 0.8907 | 0.5040 | 3.969 |
| 0.25 | 2.235 | 95.95 | 13.79 | 4.499 | 1.939 | 0.7260 | 19.86 |
| 0.5 | 26.09 | 4.279 | 38.21 | 9.459 | 5.487 | 5.455 | 14.83 |
| 0.75 | 3.631 | 4.475 | 14.06 | 15.73 | 1.717 | 1.453 | 6.843 |
| 1 | 1.883 | 2.196 | 10.18 | 7.623 | 1.577 | 1.698 | 4.193 |
| 3 | 3.227 | 7.088 | 8.120 | 3.085 | 1.153 | 1.027 | 3.950 |
| 5 | 2.821 | 6.139 | 5.520 | 1.879 | 2.264 | 4.561 | 3.864 |
| 8 | 4.121 | 3.296 | 5.004 | 4.751 | 2.660 | 3.997 | 3.972 |
| 12 | 6.088 | 6.552 | 1.330 | 3.215 | 4.453 | 2.711 | 4.058 |
| 24 | 4.465 | 4.505 | 5.242 | 1.816 | 4.803 | 2.636 | 3.911 |

Time(h)

B11 (ng·mL-1)

x



(a,B3;b,BD;c,B7;d,B10;e,B11)

(a)

Time(h)

B3 (ng·mL-1)

x

Time(h)

x

Table3- 8 Plasma concentrations of five pulchinenosides after intravenous administration 0.15mg·kg-1 of PRS extract salt to seven rats,respectively (mean ± S.D.)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |  |
| 0.033 | 138.63 | 143.25 | 110.76 | 94.54 | 91.06 | 182.37 | 116.16 | 125.25 |
| 0.083 | 75.41 | 96.87 | 69.72 | 59.49 | 57.4 | 117.42 | 87.17 | 80.5 |
| 0.25 | 38.15 | 16.9 | 26.71 | 27.8 | 17.39 | 29.78 | 37.45 | 27.74 |
| 0.5 | 34.48 | 7.589 | 10.88 | 9.884 | 6.93 | 6.936 | 12.81 | 12.79 |
| 1 | 6.343 | 3.356 | 2.837 | 2.492 | 0.2903 | 2.422 | 3.656 | 3.057 |
| 2 | 1.08 | 0.8213 | 0.8231 | nd | 0.2314 | nd | 0.8868 | 0.7684 |
| 4 | 0.9427 | 0.218 | nd | nd | nd | nd | nd | 0.5804 |
| 6 | 0.2934 | nd | nd | nd | nd | nd | nd | 0.2934 |
| (b) |  |  |  |  |  |  |  |  |
| BD (ng·mL-1) | | | | | | | | |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |  |
| 0.033 | 13.31 | 14.32 | 12.9 | 9.174 | 11.12 | 25.34 | 12.78 | 14.14 |
| 0.083 | 5.684 | 7.282 | 4.043 | 4.244 | 4.93 | 10.76 | 7.132 | 6.296 |
| 0.25 | 2.251 | 0.7578 | 1.127 | 1.001 | 0.4153 | 2.567 | 1.873 | 1.427 |
| 0.5 | 2.474 | 0.5472 | 1.045 | 1.139 | 0.4282 | 2.192 | 1.471 | 1.328 |
| 1 | 0.362 | 0.2294 | 0.2947 | 0.8601 | 0.6283 | 1.346 | 1.258 | 0.7112 |
| 2 | nd | 0.187 | 0.0809 | 0.6844 | 0.228 | 1.575 | 1.037 | 0.6319 |
| 4 | nd | 0.1227 | nd | 0.3734 | 0.2348 | 1.159 | 1.005 | 0.5789 |
| 6 | nd | nd | nd | 0.3221 | 0.1046 | 0.9617 | 0.2423 | 0.4077 |

（c）

Time(h)

B7 (ng·mL-1)

x

1 2 3 4 5 6 7

0.033 69.42 113.6 68.8 71.83 43.87 93.94 60.93 74.63

0.083 58.99 98.61 64.63 52.15 48.94 95.66 54.23 67.6

0.25 55.4 38.12 45.01 34.13 28.82 60.33 46.41 44.03

0.5 37.76 23.72 24.82 17.23 18.31 22.96 26.34 24.45

1 17.19 11.04 8.86 12.34 5.086 14.29 10.74 11.36

2 4.985 4.076 3.068 1.795 1.177 4.217 5.119 3.491

4 1.695 0.8153 0.7281 0.4788 nd 1.739 0.6424 1.016

6 0.1182 0.1948 0.1168 nd 0.2148 0.07262 0.2627 0.1633

(d)

Time(h)

B10 (ng·mL-1)

x

1 2 3 4 5 6 7



0.033

0.083

0.25

0.5

1

2

4

6

15.84

15.43

13.97

9.345

3.802

0.6869

nd nd

31.39

27.4

11.52

7.446

2.986

0.9023

0.1785

nd

15.37

14.43

14.89

7.749

2.205

0.04898

nd nd

17.38

16.18

11.27

5.514

1.874

0.09922

0.03592

nd

12.84

10.8

9.52

4.761

0.9299

nd nd nd

21.03

20.89

16.79

5.812

3.041

1.085

0.017

0.2271

17.49

17.05

12.82

7.32

3.099

1.28

nd nd

18.76

17.46

12.97

6.849

2.563

0.6839

0.07713

0.2271

(e)

Time(h)

0.033

0.083

0.25

0.5

1

2

4

6

1

16.51

9.549

4.523

0.9639

0.2634

0.1855

0.05026

nd

2

25.99

15.16

1.724

1.307

0.2376

0.1113

0.08226

0.005645

B11 (ng·mL-1)

3 4

11.95 12.44

9.132 7.531

2.306 1.341

0.7821 0.2824

0.1795 0.08715

0.06142 0.2016

nd nd

nd nd

5

8.186

7.385

1.316

0.2575

nd nd nd nd

6

24.4

19.18

2.594

0.762

0.2459

0.1939

0.163

0.05571

7

12.72

11.13

3.344

1.222

0.4796

0.374

0.08161

nd

x

16.03

11.29

2.45

0.7967

0.2489

0.188

0.09428

0.03068

250



Concentration(mg/mL)

**b**

160



200

Concentration( ng/ m L)

120

150

80

100

40

50

0

0 5 10 15 20 25

Time(h)

0

0 1 2 3 4 5 6

Time( h)

25

Concentration(ng/mL)

20

20

Concentration(ng/mL)

15

15

10

10

5

5

0

0 5 10 15 20 25

Time(h)



80 **a**

0

100

Con cent rati on( ng/m L)

0 1 2 3 4 5 6

Time(h)

**b**

75

60 **B7 (oral)**

Concentration( ng/ m L)

**B7 (intravenous)**

40 50

20 25

0

0 5 10 15 20 25

Time(h)

45 **a**

Concentration(ng/mL)

0

0 1 2 3 4 5 6

Time( h)

25 **b**

20

Concent ration( ng/ m L)

30

15

10

15

5

0

0 5 10 15 20 25

Time(h)

0

0 1 2 3 4 5 6

Time( h)

25

Concentration(ng/mL)

24 20

Concentration(ng/ mL)

**B11 (intravenous)**

15

16

10

8

5

0

0 5 10 15 20 25

Time(h)

0

0 1 2 3 4 5 6

Time( h)

Fig.3- 4 Mean plasma concentration vs time profiles of five pulchinenosides:(a) after oral administration of PRS extract (300mg·kg-1)(mean±SD,n=6),and (b) intravenous administration of PRS

extract sodium salt to rats (0.15mg·kg-1) (mean±SD,n=7)

### 3.3.3 药代动力学参数的计算

药动学参数采用非房室模型，在DAS 2.0 software (Chinese Pharmacological

Society）上进行。结果表明口服后5种白头翁皂苷快速吸收，30 min左右达最大峰浓度，然后很快被消除。有关药代动力学参数见Table3- 9。

Table3- 9 The main pharmacokinetics parameters and bioavailabilities of five pulchinenosides after single oral administration of PRS extract (300mg·kg-1)(mean±SD, n=6) and intravenous administration of PRS extract sodium salt(0.15mg·kg-1) (mean±SD, n=7) to rats, respectively

Comp

Oral administration Intravenous administration

Bioavai lability

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | (ng·mL-1) | (h) | (h) | (µg·L-1\*h) | (h) | (ng·mL-1) | (h) | (µg·L-1\*h) |  |
| B3 | 338.09±93.71 | 0.33±0.13 | 12.81±8.70 | 731.4±328.1 | 18.8±9.4 | 120.25±28.01 | 0.43±0.32 | 31.5±7.4 | 1.16 |
| BD | 36.61±24.84 | 0.37±0.11 | 18.52±9.63 | 172.7±72.5 | 27.3±10.2 | 16.14±6.31 | 2.23±0.53 | 7.4±1.4 | 1.17 |
| B7 | 103.59±104.87 | 0.51±0.21 | 16.31±10.04 | 473.3±258.5 | 24.7±12.6 | 73.91±21.72 | 0.56±0.25 | 42.7±12.1 | 0.55 |
| B10 | 48.15±24.72 | 0.51±0.24 | 7.03±2.11 | 191.2±68.2 | 19.1±6.5 | 19.02±6.71 | 0.35±0.11 | 10.0±2.6 | 0.96 |
| B11 | 30.27±12.85 | 0.51±0.23 | 12.54±8.32 | 174.2±107.3 | 21.5±11.3 | 15.30±6.81 | 0.34±0.22 | 3.5±1.3 | 2.50 |

onents

Cmax

Tmax

T1/2

AUC0-∞

MRT0-∞

Cmax

T1/2

AUC0-∞

Fa (%)

### 3.3.4 生物利用度计算

生物利用的计算公式如下：



aF=[(Doseiv×AUC0-∝) /(Dose×AUC0-∝)]×100%

oral oral iv

经过计算，见Table3- 9，白头翁皂苷B3，BD，B7，B10, B11口服给药后在大鼠体内的生物利用度分别为：1.16%, 1.17%, 0.55%, 0.96%, 2.50%。

## 3.4 讨论

### 3.4.1 白头翁皂苷的药动学行为与生物利用度

由药时曲线可见，5 种白头翁皂苷表现出较快的吸收和明显的双峰现象，第1 个吸收峰出现在30 min 内，第2 个吸收峰出现在8-12 h。引起这种现象的原因可能

是：第1个吸收峰是口服吸收峰，第2个吸收峰可能是由肝肠循环引起。这一现象在中药的药动学特征中较为多见，与中药成分的复杂性，成分间相互作用有关[1, 2, 3]。

5种白头翁五环三萜皂苷的口服绝对生物利用度均小于2.5%，与其他皂苷类似，这类成分普遍存在低生物利用度的问题[4, 5, 6]，这与皂苷类化合物分子量较大相关。本课题

的5 种白头翁皂苷中最小分子量为733.5 Da，均大于肠吸收规则中分子量小于500

Da的特征[7]。当然，造成这类皂苷生物利用度很低的原因很多，可能与药物的吸收，代谢，肠道微生物对药物的转化等因素相关，具体原因有待于进行肠吸收、排泄研究进一步证明。

### 3.4.2 白头翁皂苷口服和静注样品的制备

在绝对生物利用度研究中，口服和静脉注射都采用纯化后的化合物，这是研究单个化学药物绝对生物利用的主要方式[8, 9]。鉴于中药的复杂性[10]，中药中所有化学成分潜在的相互作用不能忽略，研究时应考虑中医药整体观的理论基础。所以，采用白头翁总皂苷提取物对大鼠平行地进行口服和静脉给药实验，更接近于实际的处置特征；同时兼顾了中药各成分之间的相互作用会给绝对生物利用度评价带来的影响，因此获得数据更为科学、合理。



鉴于白头翁皂苷极弱的水溶性，我们将其溶解在含0.5% CMC-Na的水溶液中得到口服用均匀分散悬浮液（18.75 mg·mL-1）。但静脉注射给药需要制备澄清注射液，白头翁皂苷水溶液无法满足这一要求，因此我们制备其钠盐溶液供大鼠静脉注射。对含有羟基官能团的化合物，这是一个较好的方法。

白头翁皂苷钠盐的制备：18.75 mg·mL-1的白头翁总皂苷水溶液中缓慢加入氢氧化钠饱和溶液，调节pH至8.5。pH值选择是根据我们前期预实验的结果，即通过比较pH 6,8,8.5,9这四个水平后发现当pH 8.5时，白头翁皂苷钠盐可以获得最大表观溶解度。

### 3.4.3 血浆样品前处理方法

生物样品预处理方法主要有液-液萃取法、固相萃取法和沉淀蛋白法。本实验曾经尝试了沉淀蛋白法和液-液萃取法。由于沉淀蛋白法内源性物质去除不完全，对仪器污染大，因此我们重点考察了液-液萃取法(LLE)与固相萃取法（SPE）。对于萃取溶剂的选择，曾经尝试了乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、正丁醇和二氯甲烷-乙酸乙酯(95:5, v/v)等有机溶剂。实验发现，二氯甲烷-乙酸乙酯(95:5, v/v)作为萃取溶剂可以获得较好的回收率，但是所得色谱图中存在一个显著的内源性杂质峰的干扰，严重影响结果。而采用C18填料的固相萃取小柱，以水为淋洗液，以90%甲醇水为洗脱剂进行样品前处理，可以获得干净的待分析样品，并能够保证合适的回收

率，5种白头翁皂苷的提取回收率均不低于70%。样品的复溶步骤，通过对不同比例的甲醇水溶液复溶效率的考察表明，采用90%甲醇比70%甲醇复溶能获得更高的回收率。

### 3.4.4 同分异构体现象

大鼠口服和静脉注射白头翁总皂苷后的血浆样品的测定中，在B3的MRM色谱图中其峰后有一未知峰跟随[见Fig.3- 3(c)]。我们通过比较白头翁总皂苷的色谱图，确定这个未知峰来自白头翁皂苷而不是B3的代谢产物，应是同时吸收入血的B3同分异构体。中药组成成分复杂，在中药的生物样品测定中这一现象值得关注。

### 3.4.5 **RRLC-MS/MS**方法优化

（1）流动相选择：为了增强离子响应和保证血浆样品中的白头翁皂苷同分异构体的分离效果，我们考察了不同的流动相系统和不同的梯度条件。结果表明采用2 mmol·L-1醋酸铵为流动相，并以梯度洗脱的方式，可以保证白头翁皂苷B7和其同分异构体B10，以及B3和其未知的同分异构体在5 min之内较好地分离。



（2）质谱条件的优化：由于五环三萜皂苷的结构特征中含有多个羟基、羧基和糖基，参考文献报道[11,12,13,14] ESI离子源在皂苷测定时比其他离子源能获得更高的灵敏度和更好的重复性。对正离子模式和负离子模式的考察显示，正离子模式下[M+Na]

+为主要离子，负离子模式下[M-H] -为主要离子。结果显示正离子模式下可以获得更多的分子离子峰。于是，我们首先对[M+Na] +或[M+H] +母离子经碰撞诱导分离

（CID）后的子离子进行全扫描，但是在所进行的实验条件和实验设备下没有寻找到特征碎片离子。于是，我们采用负离子模式进行扫描，同样没有获得白头翁皂苷明显的二级碎片信息。在对母离子和子离子的考察实验中，这5 种五环三萜类白头翁皂苷

均出现了同样的情况。在Agilent 6460三重四级杆色谱仪中虽然这5个皂苷母离子信息的获得相对容易，但是碎片离子信息未获取。考虑到质谱扫描模式的不同特点，选择离子检测模式(SIM)比TIC 扫描模式有更高的灵敏度，因此我们采用了SIM模式并结合皂苷大都是在母环不断裂的情况下糖基发生脱落的MS2碎片大致相同的产生途径，获得5种白头翁皂苷的二级子离子。即911.4→603.2 (B3), 749.4→471.3 (BD), 895.6→733.2 (B7/B10), 733.5→455.3 (B11) 和内标连翘苷的离子 对

579.3→371.1，常春藤皂苷元的离子对为471.1→393.3。

为了获得这5种皂苷成分最大灵敏度，在确定离子对的基础上进一步对两个重要的参数，即毛细管传输电压(fragmentor voltage, FV) 和碰撞能量（collision

energy, CE）进行了优化。其余质谱参数由于对化合物响应影响较小，故采用仪器默认值。毛细管传输电压影响了白头翁皂苷母离子[M-H] -最大灵敏度，通过对其进行优化调整，最终获得各皂苷合适的FV参数值。碰撞能量是母离子裂解产生子离子的一个重要条件，优化时先逐步提高碰撞能量，发现产物离子信号首先逐步达到最大，然后逐渐降低。当产物离子强度相应达到最大时，完成碰撞能量优化。B3，BD，B7，

B10, B11和连翘苷的FV和CE参数值最终确定为285, 250,285, 290, 255 135 (V)

和50, 52, 50, 57, 57, 20 (V) 。

### 3.4.6 常春藤皂苷元的监测

对于一些皂苷成分，由Ⅰ相代谢在体内转化而来的苷元是其生物活性成分

[15,16,17]. 有文献对血浆中的常春藤皂苷元(Fig.3- 1)进行测定[12]，鉴于B3，BD为该类型皂苷，因此，在本次研究中，我们设定了471.1→393.3的离子对，对灌胃和静注白头翁皂苷后的大鼠血浆中常春藤皂苷元进行监测，但在所建立的检测条件下，所有血浆样品中均未测到该苷元，结果表明常春藤皂苷元不是B3和BD在血液中的主要代谢产物。



### 3.4.7 溶血现象

与其他皂苷类成分相似，静脉注射后通过血液样品的采集可见明显的溶血现象。在我们所采用的0.15mg·kg-1的剂量下，可见溶血现象在1 h后消失。在静注给药剂量的预实验中通过考察不同给药量表明，剂量越大，溶血现象越严重，当剂量达到1 mg·kg-1时，实验动物全部发生死亡。这一现象提示安全剂量范围对白头翁皂苷静脉途径给药至关重要。

参考文献

[1] Chen C Y, Qi L W, Yi L, et al. Liquid chromatography–mass spectrometry analysis of macranthoidin B, macranthoidin A, dipsacoside B, and macranthoside B in rat plasma for the pharmacokinetic investigation [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 877(3): 159–165.

[2] Li P F, Zhang Y, Xiao L, et al. Simultaneous determination of harpagoside and cinnamic acid in rat plasma by high-performance liquid chromatography: application to a pharmacokinetic study [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389(7-8): 2259-2264.

[3] Liu W Y, Li P, Feng F, et al. Quantitative determination of ilexgenin A in rat plasma by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and its pharmacokinetics [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2010, 19(1): 38-42.

[4] Liu, H F, Yang J L, Du F F, et al. Absorption and disposition of ginsenosides after oral administration of Panax notoginseng extract to rats [J]. *Drug Metab. Dispos*, 2009, 37(12): 2290-2298.

[5] Li X Y, Wang G J, Sun J G, et al. Pharmacokinetic and absolute bioavailability study of total panax notoginsenoside, a typical multiple constituent traditional Chinese medicine (TCM) in rats [J]. *Biol. Pharm. Bull*, 2007, 30(5): 847-851.

[6] Xu Q F., Fang X, L, Chen D F. Pharmacokinetics and bioavailability of ginsenoside Rb1 and Rg1 from Panax notoginseng in rats [J]. *J. Ethnopharmacol*, 2003, 84(2-3): 187-192.

[7] Egan W J, Jauric G. Prediction of intestinal permeability [J]. *Adv Drug Rev*, 2002, 54(3): 273-289.

[8] Liu L, Liu K N, Wen Y B, et al. Development of a fully automated on-line solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detection method for the pharmacokinetic evaluation of bavachinin: a study on absolute bioavailability and dose proportionality [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, 893-894: 21-28.

[9] Guidance for industry, Bioanalytical method validation (updated 2001)[. ht](http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm)t[p: //www. fda. gov/cder/guidance/index. htm.](http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm)

(U. S. Department of Health and Human Services, Guidance for Industry—Bioanalytical Method Validation, Food and Drug Administration, Center

ForDrugEvaluationandResearch, May2001, [http: //www. fda. gov/cder/guidance/4252fnl. pdf.)](http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf.))

[10] Yuan R, Lin Y. Traditional Chinese medicine: an approach to scientific proof and clinical validation [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2000, 86(4): 191–198.

[11] Cai Z W; Lee F S C, Wang X R, et al. A Capsule Review of Recent Studies on the Application of Mass Spectrometry in the Analysis of Chinese Medicinal Herbs [J]. *Mass Spectrom*, 2002, 37(10): 1013–1024.

[12] Zhu H, Ding L, Shakya S, et al. Simultaneous determination of asperosaponin VI and its active metabolite hederagenin in rat plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with positive/negative ion-switching electrospray ionization and its application in pharmacokinetic study [J]. *Journal of Chromatography B*, 2011, 879(30): 3407-3414.

[13] Zheng Y F, Qi L W, Zhou J L, et al. Structural characterization and identification of oleanane-type triterpene saponins in Glycyrrhiza uralensis Fischer by rapid-resolution liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(22): 3261–3270.

[14] Qiao X, Zhang X, Ye M, et al. Rapid characterization of triterpene saponins from Conyza blinii by liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *Rapid Commun. Mass Spectrom,* 2010, 24(22): 3340-3350.

[15] Ha Y W, Na Y C, Ha I J, et al. Liquid chromatography/mass spectrometry-based structural analysis of new platycoside metabolites transformed by human intestinal bacteria [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(1): 202-209.

[16] Komoto N, Ichikawa M, Ohta S, et al. Murine metabolism and absorption of lancemaside A, an active compound in the roots of Codonopsis lanceolata [J]. *J Nat Med*, 2010, 64(3): 321-329.

[17] Cai Z, Qian T, Wong R N S, et al. Liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry for metabolism and pharmacokinetic studies of ginsenoside Rg3 [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 492(1-2): 283-293.

## 第四章 白头翁皂苷的大鼠肠吸收研究

研究药物的肠吸收机制和吸收部位对于指导各种制剂的处方设计，尤其是缓控释制剂的处方设计具有重要意义。预测口服药物体内吸收的方法有体外研究法、在体法和体内法等三种[1]，其中，体外研究法包括组织流动室法、外翻肠囊法、外翻环法、细胞培养模型法等；在体法主要是肠灌流法，包括单向灌流法和循环灌流法；体内法是通过口服给药，测定体内药量及尿中原型药物排泄总量，求算药物动力学参数，评价药物的吸收速度和吸收程度[2]。本课题组前期已采用体内法口服给予大鼠白头翁总皂苷提取物，测定体内药物浓度，求算其药动学参数和生物利用度。陈振华等[3]采用离体外翻肠囊模型研究常春藤皂苷3-O-α-L-吡喃鼠李糖-(1→2) -[β-D-吡喃葡萄糖



-(1→4)]-L-吡喃阿拉伯糖苷（即白头翁皂苷B3）在不同肠段、不同药物浓度下的肠吸收特性。由于离体法会损伤研究部位的淋巴和循环系统，降低实验结果与人体试验结果的相关性，且其只对一种白头翁皂苷B3进行研究，故本课题组采用能很好模拟人体内环境的单向灌流法更全面地研究白头翁皂苷B3、BD、B7、B10、B11的肠吸收特征。

## 4.1 仪器与材料

### 4.1.1 仪器

Agilent 1100高效液相色谱系统：四元泵(G1311)，在线脱气机(G1322)，柱温箱(G1316C)，蒸发光散射检测器(ELSD) (美国Alltech公司)；Agilent 1100化学工作站；HL- 2恒流泵（上海沪西分析仪器厂）；十万分之一天平（北京赛多利斯仪器系统有限公司）；HH-S数显恒温水浴锅（江苏省金坛市医疗仪器厂）；SZ-93自动双重水蒸馏器（上海雅荣生化仪器设备有限公司）；微量移液枪（上海大龙医疗设备有限公司）；SPE固相微萃取小柱(Agela Cleanert ODS C18, 200mg/3mL); DT5-3型低速台式自动平衡离心机（北京时代北利离心有限公司） ；IKA 涡旋仪；KQ3200E 型超声波仪。

### 4.1.2 药品与试剂

白头翁皂苷制备见《白头翁总皂苷的化学成分及其含量测定研究》部分，5 种皂

苷的标准品(B3, BD, B7, B10, B11)（纯度> 98%）制备同样见《白头翁总皂苷的化学成分及其含量测定研究》部分。

乌拉坦（国药集团化学试剂有限公司，批号：T20110214）；维拉帕米（中国药品生物制品鉴定所，批号：100223-200102）；甲醇（色谱纯，上海星空生化有限公司）；吐温-80为化学纯，液相用水由Milli-Q超纯水设备制备，其它试剂均为分析纯。

Kreb-Ringer's营养液(K氏液，每1 L含NaCl 7.8 g, KCl 0.35 g, CaCl2 0.37 g, NaH2PO4 0.32 g, NaHCO3 1.37 g, MgCl2 0.02 g, 葡萄糖1.4 g) 。

### 4.1.3 实验动物

雄性无菌Wistar大鼠(*n*=12, 200-220 g) 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供（中国长沙）。实验前3天饲养于昼夜自然循环的控制环境中[22±2℃，RH（50

±20）%]。动物实验遵循中华人民共和国国家科学技术委员会实验动物管理条例。



### 4.1.4 白头翁总皂苷提取物的制备

白头翁皂苷提取物制备：见《白头翁总皂苷的化学成分及其含量测定研究》部分。

### 4.1.5 大鼠在体肠单向灌流实验

#### 4.1.5.1 手术方法

选取实验前禁食18 h（自由饮水）的大鼠，腹腔注射20%乌拉坦溶液麻醉并固定，用红外灯保持37℃体温，沿腹中线打开腹腔3 cm结扎胆总管，按以下方法取肠道各段，在两端剪切后插管，并用线扎紧。十二指肠段自幽门1 cm处开始，空肠段自幽门15 cm处开始，回肠段自盲肠上行20 cm处开始，结肠自盲肠后端开始，

各段均取10 cm. 以5 mL·min- 1流速用37℃ K

氏液冲洗肠管内容物至净，将伤口

用浸有生理盐水的脱脂棉覆盖保湿。将大鼠肠道连接到灌流装置。

#### 4.1.5.2 操作方法

取预热至37℃的供试液以0.3 mL·min-1流速灌流30 min，平衡管路及肠段，并开始计时，进液口用已知重量的装有灌流液的小瓶灌流，出液口处用另一已知重量的小瓶收集流出液，每隔15 min迅速更换一次灌流液小瓶和收集液小瓶，称重，测出白头翁皂苷的质量浓度，实验持续时间为75 min (15 min×5)。处死大鼠，测出肠道内径与长度。

#### 4.1.5.3 数据处理

采用重量法计算药物吸收速率常数(*Ka*)和渗透系数(*Peff*)：

*Ka*= Q·(1-CoutQout/CinQin) /V

*Peff*= Q·(Cin-Cout) /Cout·2πrl

其中，Qin和Qout分别为肠段灌入的灌流液和收集液的体积(mL) (假定灌流液和收集液的密度均为1.0 g·mL-1)，l和r分别为灌流肠段的长度(cm)和横截面半径(cm), Q 为灌流速度，Cin 和Cout 分别为灌流液和收集液的浓度(mg·mL-1)，V 为灌流肠段的体积(cm3)。根据Grubbs检验法对每个肠段获得的若干个*Ka*和*Peff*值分别进行偶然误差值的取舍，取舍后必须保证至少有3个以上的*Ka*和*Peff*值无显著误差，计算其平均值，即得*Ka* 和*Peff*。

## 4.2

分析方法的建立与验证



**4.2.1** 标准溶液和肠吸收液的制备

**4.2.1.1** 储备液和对照品溶液的制备

以甲醇为溶剂，精密配制含白头翁皂苷 B3，BD，B7，B10 和 B11 分别为 3.180、

0.4100、0.4900、0.2200 和 0.1600 mg·mL-1 的混合标准贮备液，置 4℃ 保存。

分别精密量取白头翁皂苷储备液适量置 10 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度， 配置成白头翁系列标准溶液。如 Table4- 1。

Table4- 1 Series of working solutions of five pulchinenosides

working solutions

B3 BD B7 B10 B11

**4.2.1.2** 样品处理

取肠吸收液 200 µL，甲醇 200 µL，SPE 柱分离，3 mL 超纯水淋洗，3 mL 甲醇

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| /mg.mL-1 |  | | | | |
| 1 | 0.9785 | 0.1262 | 0.1508 | 0.06779 | 0.04923 |
| 2 | 1.193 | 0.1538 | 0.1838 | 0.08250 | 0.06000 |
| 3 | 1.590 | 0.2050 | 0.2450 | 0.1100 | 0.08000 |
| 4 | 1.908 | 0.2460 | 0.2940 | 0.1320 | 0.09600 |
| 5 | 2.385 | 0.3075 | 0.3675 | 0.1650 | 0.1200 |
| 6 | 3.180 | 0.4100 | 0.4900 | 0.2200 | 0.1600 |

洗脱，收集甲醇洗脱液，N2吹干，0.1 mL甲醇复溶，漩涡振荡2 min，0.45µM 微

孔滤膜滤过。SPE柱使用之前经2 mL甲醇和2 mL去离子水活化处理。同时做空白实验。

### 4.2.2 分析方法的建立

#### 4.2.2.1 色谱条件

色谱柱ODS COSMOSIL C18 (5µm,250mm×4.6mm);

流动相A为甲醇，B为水，梯度洗脱，程序为0 ~ 30 min, A (75% ~ 90%)；流速1.0 mL·min-1；柱温25℃；蒸发光散射检测器漂移管温度为75℃，气体流速为2.0

L・min-1；进样体积20µL。

#### 4.2.2.2 标准曲线的建立

取空白肠吸收液200µL，200µL系列工作溶液，其余按照“样品处理”项下方法处理。取所得滤液20µL，按照色谱条件，注入HPLC-ELSD进行分析。并进样分析。记录白头翁皂苷B3, BD, B7, B10, B11的峰面积，分别以肠吸收液中各待测成分

的浓度为横坐标（x），各待测成分的峰面积为纵坐标（y），作线性回归，得白头翁皂苷的标准曲线方程。



#### 4.2.2.3 精密度实验

取空白肠吸收液200 µL，加入高、中、低（分别含B3 (0.9785, 1.908, 3.180

Mg·mL-1), BD(0.1262, 0.2460, 0.4100 mg·mL-1), B7 (0.1508, 0.2940, 0.4900 mg·mL-1)，

B10 (0.06769, 0.1320, 0.2200 mg·mL-1) 和 B11 (0.04923, 0.09600, 0.1600 mg·mL-1)) 3

个不同浓度的对照品溶液200µL，其余按照“样品处理”项下方法处理。取所得滤液20µL，按照色谱条件，注入HPLC-ELSD进行分析。每个浓度制备6份，每个浓度连续进样6次，测定日内精密度。重复操作，连续测定3天并随行标准曲线，计算日间精密度。

#### 4.2.2.4 提取回收率实验

取6个不同来源的大鼠空白肠吸收液200µL，200µL高、中、低3个不同浓度的对照品溶液，其余按照“样品处理”项下方法处理，取20µL进HPLC-ELSD分析，记录各待测化合物经提取后得到峰面积(A1)。另取6个不同来源的大鼠空白肠吸收液200µL, SPE分离，3 mL超纯水淋洗，3 mL甲醇洗脱，收集甲醇洗脱液，加入200µL高、中、低3个不同浓度的对照品溶液，N2吹干，0.1 mL甲醇复溶，

漩涡振荡2 min，0.45µM微孔滤膜滤过，取20µL进HPLC-ELSD分析，记录未经提取直接进样获得的色谱峰面积(A2)。计算提取回收率(A1/A2×100%)。

#### 4.2.2.5 样品稳定性实验

样品稳定性评价为待测物样品室温24 h放置的稳定性。

### 4.2.3 方法学验证结果分析

#### 4.2.3.1 方法专属性

在建立的HPLC-ELSD条件下，5个白头翁皂苷色谱图具有较高选择性，色谱峰良好，内源性物质无干扰。典型色谱图见Fig.4- 1。



ADC1 A, ADC1 CHANNEL A (LYL\20130812\用于论文的HPLC-ELSD文件\BLANK. D)

**a**

mAU

160

140

120

100

80

60

40

20

0

5 10 15 20 25

0

min

ADC1 A, ADC1 CHANNEL A (LYL\20130812\用于论文的HPLC-ELSD文件\BLANK+BTW. D)

mAU

160

140

120

100

80

60

40

20

0

B3

BD B7

B10

B11

0 5 10 15 20 25

min

mAU

**c**

160

140

120

100

80

60

40

20

0

ADC1 A, ADC1 CHANNEL A (LYL\20130812\用于论文的HPLC-ELSD文件\SAMPLE. D)

B3

B7

BD B10 B11

0

5

10

15

20

25

min

Fig.4- 1 Representative HPLC-ELSD chromatograms of five pulchinenosides, (a) blank perfusate, (b) blank perfusate spiked with the five analytes, (c) typical sample perfusate of PRS extract.

#### 4.2.3.2 标准曲线和线性范围

分析物质的线性范围、回归方程和相关系数见表。以质量浓度(C)为横坐标，以白头翁皂苷峰面积(A)为纵坐标，作线性回归。标准曲线范围满足肠吸收液样品的浓度要求，5个分析样品在0.9785-3.180 mg·mL-1 (B3), 0.1262-0.4100 mg·mL-1 (BD), 0.1508-0.4900 mg·mL-1 (B7), 0.06769-0.2200 mg·mL-1 (B10), 0.04923-0.1600 mg·mL-1

（B11） 的范围内线性较好，*r2*> 0.99. 见Table4- 2.

Table 4- 2 Regression data of the multi-components determined

| Components | Linear range (mg·mL-1) | Linear regression equation | Correlation coefficient (r2) |
| --- | --- | --- | --- |
| B3 | 0.9785-3.180 | y=402.32x+476.51 | 0.9901 |
| BD | 0.1262-0.4100 | y=217.20x+43.951 | 0.9975 |
| B7 | 0.1508-0.4900 | y=304.40x+70.3343 | 0.9932 |
| B10 | 0.06769-0.2200 | y=290.23x+24.506 | 0.9915 |
| B11 | 0.04923-0.1600 | y=494.97x+18.428 | 0.9978 |

#### 4.2.3.3 精密度

方法精密度和准确度见Table4- 3。日内和日间精密度分别为2.77% ~ 8.23% 和

2.93% ~ 9.17%。

Table4- 3 Precision of B3,BD,B7,B10 and B11 for HPLC-ELSD method (*n*=6)



|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Spiked | | Intra-day | Inter-day | | |
| (mg·mL-1) | | concentration | Precision | concentration | Precision |
| Components | | Measured |  | Measured |  |
|  |  | (mg·mL-1) | (RSD,%) | (mg·mL-1) | (RSD,%) |
| B3 |  |  |  |  |  |
|  | 0.9785 | 0.9504 | 3.94 | 0.8709 | 3.42 |
|  | 1.908 | 1.880 | 6.61 | 2.013 | 6.71 |
|  | 3.180 | 3.191 | 5.22 | 3.075 | 5.18 |
| BD |  |  |  |  |  |
|  | 0.1262 | 0.1402 | 6.44 | 0.1209 | 4.74 |
|  | 0.2460 | 0.2603 | 3.28 | 0.2200 | 8.16 |
|  | 0.4100 | 0.3905 | 7.18 | 0.3956 | 7.69 |
| B7 |  |  |  |  |  |
|  | 0.1508 | 0.1705 | 6.74 | 0.1498 | 6.68 |
|  | 0.2940 | 0.3103 | 5.61 | 0.3305 | 9.17 |
|  | 0.4900 | 0.4898 | 8.23 | 0.4876 | 6.65 |
| B10 |  |  |  |  |  |
|  | 0.06769 | 0.06998 | 6.43 | 0.06098 | 2.93 |
|  | 0.1320 | 0.1106 | 5.17 | 0.1501 | 4.52 |
|  | 0.2200 | 0.2308 | 8.13 | 0.2078 | 4.33 |
| B11 |  |  |  |  |  |
|  | 0.04923 | 0.05109 | 3.26 | 0.04807 | 6.51 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 0.09600 | 0.1001 | 4.66 | 0.08008 | 8.23 |
| 0.1600 | 0.1507 | 2.77 | 0.1437 | 3.31 |

#### 4.2.3.4 提取回收率

如Table4- 4，白头翁皂苷B3、BD、B7、B10和B11的平均提取回收率为75.16%

~ 99.44%, RSD≤8.2%。

Table 4- 4 Extraction recovery of B3, BD, B7, B10 and B11 for HPLC-ELSD method

Extraction recovery

#### 4.2.3.5

稳定性

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Components | Spiked (mg·mL-1) |  | |
|  |  | Recovery(%) | RSD(%) |
| B3 |  |  |  |
|  | 0.9785 | 99.44 | 3.8 |
|  | 1.908 | 94.66 | 6.4 |
|  | 3.180 | 94.30 | 8.2 |
| BD |  |  |  |
|  | 0.1262 | 96.83 | 4.3 |
|  | 0.2460 | 95.61 | 5.7 |
|  | 0.4100 | 98.47 | 4.9 |
| B7 |  |  |  |
|  | 0.1508 | 87.77 | 6.5 |
|  | 0.2940 | 87.03 | 3.4 |
|  | 0.4900 | 94.67 | 6.9 |
| B10 |  |  |  |
|  | 0.06769 | 84.65 | 7.8 |
|  | 0.1320 | 87.96 | 4.4 |
|  | 0.2200 | 89.07 | 4.1 |
| B11 |  |  |  |
|  | 0.04923 | 75.16 | 7.2 |
|  | 0.09600 | 92.70 | 3.7 |
|  | 0.1600 | 95.09 | 4.1 |

实验结果的稳定性见Table4- 5。表明肠灌流液中的分析物质室温静置24 h (RE:

−10.0% ~ 14.2%, RSD≤10.0%)的条件下稳定。

Table4- 5 Stability for analysis of B3, BD, B7, B10 and B11 in intestinal perfusate (*n*=6)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Spiked Measured | | | RSD | RE |
| Components | (mg·mL-1) | Concentration(mg·mL-1) | (%) | (%) |
| B3 |  |  |  |  |
|  | 0.9785 | 0.9873 | 4.3 | 0.9 |
|  | 1.908 | 1.967 | 2.4 | 3.1 |
|  | 3.180 | 3.539 | 4.9 | 11.3 |
| BD |  |  |  |  |
|  | 0.1262 | 0.1214 | 5.8 | -3.8 |
|  | 0.2460 | 0.2809 | 10.0 | 14.2 |
|  | 0.4100 | 0.4260 | 3.9 | 3.9 |
| B7 |  |  |  |  |
|  | 0.1508 | 0.1659 | 6.4 | 10.0 |
|  | 0.2940 | 0.3022 | 3.4 | 2.8 |
|  | 0.4900 | 0.4969 | 5.2 | 1.4 |
| B10 |  |  |  |  |
|  | 0.06769 | 0.06911 | 6.3 | 2.1 |
|  | 0.1320 | 0.1411 | 5.7 | 6.9 |
|  | 0.2200 | 0.1980 | 6.2 | -10.0 |
| B11 |  |  |  |  |
|  | 0.04923 | 0.04765 | 3.8 | -3.2 |
|  | 0.09600 | 0.1010 | 5.5 | 5.2 |
|  | 0.1600 | 0.1720 | 3.4 | 7.5 |

## 4.3 白头翁皂苷的肠吸收研究



### 4.3.1 肠吸收液中白头翁皂苷在不同肠段的吸收考察

取24 只大鼠随机分成十二指肠、空肠、回肠和结肠4 个肠段组，每组6 只，

均以含有白头翁皂苷提取物质量浓度0.25 mg·mL-1的灌流液（以0.5%吐温-80配制）灌流，灌流速度为0.3 mL·min-1，持续灌流75 min (15min×5)，按大鼠在体肠单向灌流实验方法操作，计算白头翁皂苷在各肠段的*Ka*和*Peff*，结果见Table4- 6和Fig.4- 2。

Table 4- 6 The absorption of B3, BD, B7, B10 and B11 among various intestinal segments at

0.25mg·mL-1(mean±SD, n=6)

Various *Ka*(×10-5min-1) *Peff(*×10-5cm·min-1)

segments B3 BD B7 B10 B11 B3 BD B7 B10 B11 Duodenum 7.26±3.47c 9.88±3.85bcd 11.27±4.13bcd 6.82±1.99 6.91±4.50 1.24±0.68c 1.63±0.42 2.22±0.83d 1.01±0.40 1.12±0.63

Jejunum 3.19±1.38 4.37±1.76a 4.69±1.93a 3.94±1.74 4.20±1.78 0.89±0.23 1.29±0.366 1.58±0.43 0.94±0.37 1.07±0.36

Ileum 2.50±1.00a 3.77±0.91a 4.47±1.37a 2.62±1.87 4.00±0.32 0.65±0.54a 0.84±0.12 1.24±0.24 0.48±0.42 0.68±0.40

Colon 4.12±3.00 4.19±1.88a 3.84±2.20a 3.84±2.54 3.06±1.57 0.98±0.31 1.24±0.60 1.13±0.18a 1.02±0.70 0.99±0.10

(Remarks: compared with in duodenum: a*P<0.05*; compared with in jejunum: b*P<0.05*; compared with in ileum: c*P<0.05*; compared with in colon, d*P<0.05*.)



Fig. 4- 2 The absorption of B3, BD, B7, B10 and B11 among various intestinal segments at 0.25mg·mL-1(mean±SD, n=6)

### 4.3.2 白头翁皂苷不同浓度对肠吸收的影响

取24只大鼠随机分成4个浓度组，每组6只，以十二指肠为灌流部位，分别以含有白头翁总皂苷质量浓度为0.05 mg·mL-1、0.25 mg·mL-1、1.00 mg·mL-1、2.50 mg·mL-1的白头翁总皂苷提取物灌流液（均以0.5%吐温-80配制）灌流，灌流速度为0.3 mL·min-1，每个质量浓度的灌流液持续灌流75 min (15min×5)，每次换液前用下一质量浓度的灌流液平衡肠段，按大鼠在体肠单向灌流实验方法操作，计算不同质量浓度白头翁皂苷在十二指肠中吸收的*Ka*和*Peff*，结果见Table4-7和Fig.4-3。将渗透系数对浓度做回归分析，考察渗透系数与浓度之间的相关性，见Table4- 8，5种白头翁皂苷的相关系数0.6007≤r2≤0.7727。

Table 4- 7 The absorption of B3, BD, B7, B10 and B11 in duodenum among different concentrations(mean±SD，n=6)

concentration *Ka* (×10-5min-1) *Peff* (×10-5cm·min-1)

mg·mL-1 B3 BD B7 B10 B11 B3 BD B7 B10 B11 0.05 4.42±3.58 8.78±6.16 5.49±4.94 6.52±3.67 3.97±1.81 0.68±0.93 2.41±1.66cd 1.61±1.95 1.68±1.86 1.96±2.04

0.25 7.26±3.50 9.88±3.85 11.27±4.12 6.82±1.99 6.92±4.50 1.24±0.68 1.64±0.42 2.22±0.84 1.01±0.40 1.12±0.63

1 3.12±1.94 4.53±5.26 3.49±4.30 3.55±3.30 3.60±1.54 0.37±0.03 0.34±0.28a 0.33±0.25 0.39±0.22 0.48±0.35

2.5 2.19±0.62 2.88±1.66 2.73±2.46 1.61±0.34 0.96±0.86 0.48±0.18 0.49±0.31a 0.38±0.37 0.08±0.07 0.22±0.12

(Remarks: compared with 0.05 mg·mL-1: a*P*<0.05; compared with 0.25 mg·mL-1: b*P*<0.05; compared with 1.00 mg·mL-1: c*P*<0.05; compared with 2.50 mg·mL-1: d*P*<0.05)



Fig. 4- 3 The absorption of B3, BD, B7, B10 and B11 in duodenum among different concentrations(mean±SD，n=6)



Table 4- 8 The Regression data between concentration and*Peff*

| Components | Linear range (mg·mL-1) | Linear regression equation | Correlation coefficient (r2) |
| --- | --- | --- | --- |
| B3 | 0.05-2.50 | y=-0.1937x+0.8765 | 0.6094 |
| BD | 0.05-2.50 | y=-0.6875x+1.8714 | 0.6007 |
| B7 | 0.05-2.50 | y=-0.6471x+1.7497 | 0.6919 |
| B10 | 0.05-2.50 | y=-0.5602x+1.322 | 0.7727 |
| B11 | 0.05-2.50 | y=-0.5892+1.5047 | 0.7135 |

### 4.3.3 **P-**糖蛋白促进剂地高辛和**P-**糖蛋白抑制剂维拉帕米对白头翁皂苷肠吸收的影响

取18只大鼠，随机分为地高辛组、灌流液组和维拉帕米组，每组6只。配制含有白头翁皂苷质量浓度0.25 mg·mL-1的提取物灌流液（A），另配制含有地高辛

0.10 mg·mL-1（B） 和维拉帕米0.10 mg·mL-1 （C） 灌流液（均以0.5% 吐温-80 配制），分别用这3种灌流液灌流十二指肠，灌流速度为0.3 mL·min-1，按大鼠在体肠单向灌流实验方法操作，分别用灌流液A、B、C溶液平衡肠道，再进行灌流，持续75

min，分别计算三种灌流液中白头翁皂苷的 *Ka* 和 *Peff*，结果见 Table4- 9 和 Fig.4- 4。Table4- 9 The absorption of B3, BD, B7, B10 and B11 in duodenum at 0.25mg·mL-1(mean±S，n=6)

components *Ka* (×10-5·min -1) *Peff* (×10-5 cm·min-1)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| B3 |  | | |
|  | Digoxin | 6.71±2.18 | 0.45±0.31 |
|  | Normal  Verapamil | 7.26±3.47  12.38±7.80a | 1.24±0.68  5.79±3.39a |
| BD | Digoxin | 6.11±1.16a | 1.05±0.44 |
|  | Normal | 9.88±3.85 | 1.63±0.42 |
|  | Verapamil | 9.43±2.76 | 4.67±3.80 |
| B7 | Digoxin | 3.42±2.26a | 2.98±1.07 |
|  | Normal | 11.27±4.13 | 2.22±0.83 |
|  | Verapamil | 19.04±1.17 | 5.00±2.31 |
| B10 |  |  |  |
|  | Digoxin | 3.30±1.18 | 1.80±0.79 |
|  | Normal | 6.82±1.99 | 1.01±0.4 |
|  | Verapamil | 7.96±2.73 | 6.39±2.34 |
| B11 |  |  |  |
|  | Digoxin | 4.11±0.71 | 1.30±2.34 |
|  | Normal  Verapamil | 6.91±4.5  12.40±2.55a | 1.12±0.63  6.2±2.14a |



Remarks：compared with normal：a*P<0.05.*

Fig.4- 4 The effects of digoxin and verapamil on five pulchinenosides(mean±*S*，*n*=6)

将地高辛组，维拉帕米组与白头翁皂苷灌流液组所得数据进行两两T-test，比较P-糖蛋白促进剂与抑制剂对白头翁皂苷吸收的影响。结果表明，加入地高辛后，BD，

B7的吸收系数与未加入地高辛前具有显著性差异（*P*<0.05）；加入维拉帕米后，B3，

B11的吸收系数、渗透系数与未加入维拉帕米前具有显著性差异（*P*<0.05）。

## 4.4 讨论

### 4.4.1 白头翁皂苷不同肠段的吸收情况考察

B3，BD和B7的吸收系数(*Ka*)，B3和B7的渗透系数(*Peff*)在不同肠段具有显著性差异（*P*<0.05）。这3种皂苷受吸收部位影响较大。

5种白头翁皂苷的吸收系数(*Ka*)和渗透系数(*Peff*)在十二指肠段最高，空肠段次之，回肠段最小，十二指肠是该类皂苷的主要吸收部位。

根据Amidon等人的研究结果表明[4]，当化合物的平均*Peff*小于1.8×10-4 cm·min-1和大于1.2×10-3 cm·min-1，可预测化合物在人体内分别为吸收差和吸收完全，本次实验白头翁皂苷在十二指肠的*Peff*≤2.22×10-5 cm·min-1，说明其为低渗透率的药物，肠道吸收较差。



### 4.4.2 不同浓度白头翁皂苷吸收情况考察

药物的跨膜转运机制分为被动转运（包括单纯扩散和膜孔转运）、载体媒介转运

（促进扩散和主动转运）和膜动转运（包括胞饮和吞噬）。

被动转运的特点是：药物从高浓度侧向低浓度侧顺浓度梯度转运；不需要载体，膜对药物无选择性；扩散过程与细胞代谢无关；不需要能量；不存在转运饱和现象和同类物竞争抑制现象。

载体媒介转运是指借助生物膜上的载体蛋白作用，使药物透过生物膜而被吸收的过程。其特点包括：需要或不需要消耗能量；需要载体物质，且载体与药物具有高度的选择性；转运速率和转运量与载体的量和活性有关，药物浓度低时，药物转运速度随药物浓度增大而加快，当药物浓度较高时，载体趋于饱和，药物转运速度渐达最大值；结构类似物能产生竞争性抑制作用。

膜动转运主要与蛋白质和多肽类等物质的吸收有关，白头翁皂苷类成分不在此范围类。

选用大鼠十二指肠段，分别用0.05 mg·mL-1、0.25 mg·mL-1、1.00 mg·mL-1、2.50 mg·mL-1供试液进行考察，结果表明，5种白头翁皂苷在质量浓度0.25 mg·mL-1时吸收系数与渗透系数均达到最大值，随着浓度提高出现过饱和现象；此外这类皂苷在十二指肠的渗透系数与浓度间的线性关系不明显(0.6007≤r2≤0.7727)。以上两点显示白头翁皂苷不完全依赖浓度梯度转运，细胞膜上的载体蛋白参与了药物的转运过程，

其小肠吸收机制并不完全为被动转运。

### 4.4.3 **P-gp** 促进剂地高辛与抑制剂维拉帕米对白头翁皂苷吸收的影响

细胞膜上存在一种“药物溢出泵”，肠道在吸收药物的同时，肠细胞上的药物转运蛋白不断地将已吸收的药物或药物的代谢物外排回肠腔，这是一个逆吸收方向的主动转运过程，其结果会导致药物的透膜吸收减少，生物利用度降低。已报道的药物转运蛋白有：P-糖蛋白(P-gp)，多药耐药相关蛋白(MRP)、有机阴离子转运载体(OAT)和有机阳离子转运载体(OCT)等。其中P-gp 为重要的药物转运蛋白。

P-gp是一种跨膜转运蛋白，其分子量约为170 ku，属于ABC转运蛋白家族，作用底物广泛，且底物结果差异也较大。P-gp的主要功能是利用ATP提供能量，将细胞内的有毒物质（包括药物）转运到细胞外。在肿瘤细胞中，P-gp大量表达，可将多数化疗药物转运出细胞，从而表现出多药耐药特性。P-gp与肠道菌群与CYP3A酶系的共同作用，对药物的吸收和生物利用度产生重要影响。

因此，白头翁皂苷作为抗肿瘤药物，有必要对这种逆向蛋白泵影响进行研究。实验分别采用P-gp的促进剂与抑制剂进行考察，结果表明加入地高辛后，白头翁皂苷的渗透系数明显降低，而加入维拉帕米后，渗透系数明显提高，说明白头翁皂苷为P-gp底物，肠细胞P-gp泵可将已吸收的皂苷外排到细胞外，P-gp的存在可降低白头翁皂苷的小肠吸收量，抑制P-gp的表达可促进这类成分的吸收，提高生物利用度。



### 4.4.4 影响白头翁皂苷生物利用度的肠吸收因素

影响药物口服生物利用度的因素很多，主要包括药物的胃肠道吸收特性、肠道微生物对药物的生物转化和肝脏的首过代谢等。

根据肠吸收研究结果，十二指肠是该类皂苷的主要吸收部位，白头翁皂苷为低渗透率药物，在大鼠肠道吸收较差；且小肠吸收机制并不完全为被动转运，存在较显著的饱和现象；同时又是P-gp的底物，具有外排可能。以上结果说明这类成分在小肠的吸收过程是造成白头翁皂苷生物利用度较低的主要原因之一。

参考文献

[1] Dressman J B, Lennernas H. Oral Drug Absorption: Prediction and Assessment [M]. Marcel Dekker, Inc, 2000.

[2] 刘亚丽, 熊贤兵, 苏丹, 等. 丰城鸡血藤中刺芒柄花素的大鼠肠吸收研究[J]. 中

国中药杂志, 2013, 38(20): 3571-3575.

[3] 陈振华, 管咏梅, 张妮, 等. 白头翁总皂苷在体外肠外翻试验中吸收特性考察[J].

中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18): 30-33.

[4] Amidon G L, Lennernas H, Shah V P, et al. A theoretical basis for a biopharmaceutics drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability [J]. *Pharm Res*, 1995, 12(3): 413-420.



## 第五章 白头翁皂苷在大鼠体内的组织分布研究

药物从吸收部位进入血浆后，在血液和组织之间的转运过程，称为药物的分布。药物的药理作用和药物在受体部位的浓度有关，通过组织分布实验，研究药物在实验动物体内的分布规律、蓄积情况，主要蓄积的器官和组织、蓄积程度等，探索其药理作用的本质[1]。

## 5.1 仪器与材料

### 5.1.1 仪器

T-18组织匀浆机（北京东方科技公司）。

其余仪器同《白头翁皂苷在大鼠血浆中的药物动力学与绝对生物利用度研究》中

“仪器”部分。



### 5.1.2 药品与试剂

白头翁皂苷制备和含量测定见《白头翁总皂苷的化学成分及其含量测定研究》部分，5种皂苷的标准品(B3, BD, B7, B10, B11)（纯度> 98%）制备同样见《白头翁总皂苷的化学成分及其含量测定研究》部分。

常春藤皂苷元和内标物质(IS)连翘苷见《白头翁皂苷在大鼠血浆中的药物动力学与绝对生物利用度研究》中“药品与试剂部分”。

试剂见《白头翁皂苷在大鼠血浆中的药物动力学与绝对生物利用度研究》中“药品与试剂部分”。

### 5.1.3 实验动物

见《白头翁皂苷在大鼠血浆中的药物动力学与绝对生物利用度研究》中“实验动物”部分。

### 5.1.4 口服用白头翁皂苷提取物的制备

口服用白头翁皂苷均匀混悬液制备见《白头翁皂苷在大鼠血浆中的药物动力学与绝对生物利用度研究》中“口服用白头翁和白头翁皂苷钠盐的制备”部分。

### 5.1.5 组织分布实验

大鼠5只，实验前禁食12 h，自由饮水，一次性灌胃300 mg·kg-1白头翁皂苷均匀混悬液，于给药后0.25 h脱颈椎处死动物，取出脑、心、肝、脾、肺、肾、睾丸、胰、脂肪、肌肉等组织，用2倍量甲醇制备匀浆。按照拟定方法测定大鼠组织中白头翁皂苷B3，BD，B7, B10和B11的含量，以不给药的相应组织匀浆为空白对照。另按同法给药后，0.5 h，2 h，6 h组织中进行药物含量测定。

## 5.2 分析方法的建立与验证

### 5.2.1 标准溶液和样品的制备

#### 5.2.1.1 储备液和对照品溶液的制备



精密称定标准物质溶解于甲醇中制成独立贮备液，B3为617µg・mL-1，BD为510µg・mL-1，B7为819µg・mL-1, B10为720µg・mL-1, B11为519µg・mL-1。临用前用甲醇按一定比例稀释为混合系列工作溶液，如Table5- 1.4℃保存。

Table 5- 1 Series of working solutions of five pulchinenosides

working

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| solutions/ng.ml-1 |  | | | | |
| 1 | 22.11 | 15.01 | 19.92 | 8.294 | 6.643 |
| 2 | 35.38 | 24.023 | 31.87 | 13.27 | 10.63 |
| 3 | 221.13 | 150.14 | 199.18 | 82.94 | 66.43 |
| 4 | 552.83 | 375.36 | 497.95 | 207.36 | 166.08 |
| 5 | 1382.08 | 938.40 | 1244.88 | 518.40 | 415.20 |
| 6 | 3455.20 | 2346.00 | 3112.20 | 1296.00 | 1038.00 |
| 7 | 6910.40 | 4692.00 | 6224.40 | 2592.00 | 2076.00 |

B3 BD B7 B10 B11

#### 5.2.1.2 质控样品的制备

质控样品(QC)采用同样方法配制成含B3(22.11,552.83,6219.36 ng·mL-1), BD (15.01,375.36,4222.80 ng·mL-1), B7(19.92,497.95,5601.96 ng·mL-1), B10(8.294,207.36,2332.80 ng·mL-1), B11(6.643,166.08,1868.40 ng·mL-1)的系列溶液。

#### 5.2.1.3 内标溶液的制备

精密称取连翘苷对照品适量溶解于甲醇中，制成浓度为1.108 mg·mL-1的储备液，临用时用甲醇配成浓度为1.108 ng·mL-1的内标溶液，储存于4℃，备用。

#### 5.2.1.4 样品处理

在已建立的血药浓度分析方法的基础上[1]，建立不同组织中药物浓度测定方法。取组织样品（精确称量），准确加入2 倍量(m/v) 甲醇制备匀浆，超声5 min,离心10 min (4200 r·min-1)，取上清液200µL，加入10µL 内标物质，20µL 甲醇溶液，200µL乙腈，N2吹干，100µL甲醇复溶，涡旋3 min，离心10 min (15000 r. min-1)，取上清液2µL进LC-MS 仪分析。

### 5.2.2 分析方法的建立

#### 5.2.2.1 **LC-MS**条件

见《白头翁皂苷在大鼠血浆中的药物动力学与绝对生物利用度研究》中“色谱条件”部分。

#### 5.2.2.2

标准曲线的建立和最低定量限

取空白组织样品（精确称量），准确加入2 倍量(m/v) 甲醇制备匀浆，超声 5

min，离心10 min (4,200 r·min-1)，取空白上清液200µL，加入10µL内标物质，20

µL系列工作溶液，其余同“样品处理”项。

记录白头翁皂苷B3，BD，B7，B10, B11与内标的峰面积，并计算5种待测成分与内标的峰面积比。分别以组织中各待测成分的浓度为横坐标，各待测成分与内标物的峰面积比值为纵坐标，以加权最小二乘法(W=l/χ2)回归绘制标准曲线。标准曲线的绘制采用7个浓度水平，每个浓度平行3份，重复3天测定。

LLOQ为连续测定6 份的准确度在实际浓度的80% ~ 120%之间，RSD小于

20%，信噪比大于5的浓度点，即为标准曲线上最低浓度点。

#### 5.2.2.3 精密度和准确度实验

取空白组织样品（精确称量），准确加入2 倍量(m/v) 甲醇制备匀浆，超声 5

min，离心10 min (4,200 r·min-1)，取空白匀浆上清液200µL，加入10µL内标物质，

20µL高、中、低浓度质控溶液，200µL乙腈，N2 吹干，100µL甲醇复溶，涡旋 3

min，离心10 min(15,000 r·min-1)，取上清液2µL进LC-MS仪分析。每个浓度制备6份，每个浓度连续进样6次，测定日内精密度。重复操作，连续测定3天并随行标准曲线，计算日间精密度。准确度通过样品的测定浓度与理论浓度的符合程度来评价，用相对回收率和相对误差来表示。

#### 5.2.2.4 提取回收率实验

取6个不同来源的大鼠空白组织匀浆上清液200µL，加入10µL内标物质，

20µL高、中、低浓度质控溶液，200µL乙腈，N2 吹干，100µL甲醇复溶，涡旋 3

min，离心10 min (15,000 r·min-1)，取上清2µL进LC-MS仪分析，记录各待测化合物经提取后得到峰面积(A1)。另取6个不同来源的大鼠空白组织匀浆各200µL，200µL乙腈，N2 吹干，加入10µL内标物质，20µL高、中、低浓度质控溶液和70

µL甲醇复溶，涡旋3 min，离心10 min(15,000 r·min-1)，取上清2µL进LC-MS 仪分析，记录未经提取直接进样获得的色谱峰面积(A2)，计算提取回收率（A1/A2×

100%）。内标物质同法测定。

#### 5.2.2.5 基质效应实验



取6 个不同来源的大鼠空白组织匀浆上清液各200µL，200µL 乙腈，N2 吹干，加入10µL内标物质，20µL高、中、低浓度质控溶液和70µL甲醇复溶，涡旋 3

min，离心10 min (15,000 r·min-1)，取上清2µL进LC-MS仪分析，分别记录5个待测化合物和内标的峰面积，计算5个待测化合物和内标的峰面积比值(A1)。另精密吸取10µL内标溶液与20µL高、中、低浓度质控溶液混匀，加入蒸馏水200µL代替空白组织上清液，200µL乙腈，N2吹干，100µL甲醇复溶，涡旋3 min，离心10 min (15,000 r. min-1)，取上清液2µL进LC-MS仪分析，每浓度6份样品。取

上清液2µL进样测定，分别记录5个待测化合物和内标的峰面积，计算5个待测化合物和内标的峰面积比值(A2)。求各浓度下5 个待测化合物的回收率（A1/A2×

100%），计算基质效应。

#### 5.2.2.6 样品稳定性实验

质控样品稳定性评价为待测物样品置于-20°C环境中1月，循环冷冻(-20°C)

和溶解（室温）3次，以及室温24 h放置的稳定性。

### 5.2.3 方法学验证结果分析

#### 5.2.3.1 方法专属性

在确定的LC-MS条件下，5个白头翁皂苷和内标物质的MRM检测具有较高选择性，色谱峰良好，内源性物质无干扰。典型色谱图见Fig.5- 1。

**B: Blank spiked** **c: Sample**

**hi**

**f**

**ors**

**y**

**t**

**n**

x10 2

-ESI 1

MRM F 1

rag=28 2

5.0V C

[ID@50.0](mailto:ID@50.0)

(911.4

-> 60

3.2) sd

6.d Smoo

th

2

3

3

4.2

4

3.8

3.6

3.4

3.2

3

2.8

2.6

2.4

2.2

2

1.8

1.6

1.4

1.2

1

0.8

0.6

0.2 0.4 0.6 0.8 1 1.2 1.4 1.6 1.8 2 2.2 2.4 2.6 2.8 3 3.2 3.4 3.6 3.8 4 4.2 4.4 4.6 4.8 5 5.2 5.4 5.6 5.8

Counts vs. Acquisition Time (min)



**B**

**D**

B

7

10

B

B

7

Fig.5- 1 Representative extract ion MRM chromatograms of forsythin(IS), five pulchinenosides, (a) blank heart homogenate, (b) blank heart homogenate spiked with the five analytes at LLOQ and IS, (c) heart homegenate sample after a single oral administration of PRS extract to rats

#### 5.2.3.2 线性范围和最低定量限

待测物的线性范围、回归方程和相关系数见

Table5- 2. 标准曲线范围满足组织样品的浓度要求，5个分析样品在2.211-691.04 ng·mL-1 (B3), 1.501-469.20 ng·mL-1 (BD), 1.992-622.44 ng·mL-1 (B7), 0.8294-259.20

ng·mL-1 (B10), 0.6643-207.60 ng·mL-1 (B11)的范围内线性较好，r2> 0.99. BD，B7，

B10和B11的最低定量限分别为2.211, 1.501，1.992, 0.8294和0.6643 ng·mL-1，变异系数分别为5.98%，12.4%，2.11%，4.13%和8.96%。

Table5- 2 Regression data of the multi-components determined.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Components | Linear range (ng·mL-1) | Linear regression equation | Correlation coefficient (*r2*) |
| B3 | 2.211-691.04 | y=0.0061x+0.0031 | 0.9908 |
| BD | 1.501-469.20 | y=0.0246x-0.0209 | 0.9922 |
| B7 | 1.992-622.44 | y=0.0100x-0.0091 | 0.9952 |
| B10 | 0.8294-259.20 | y=0.0078x+0.0025 | 0.9994 |
| B11 | 0.6643-207.60 | y=0.0203x+0.0140 | 0.9912 |

#### 5.2.3.3 准确度和精密度

方法精密度和准确度见Table5- 3. 准确度为-8.14% ~ 4.49%和-6.51% ~ 9.13%，日内和日间精密度分别为2.31% ~ 8.10%和2.59% ~ 9.55%。

Table 5- 3 Accuracies and precisions of B3, BD, B7, B10 and B11for RRLC–MS/MS method (*n*=6)



Spiked Intra-day Inter-day

Components

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | (ng·mL-1) |  |  | (ng·mL-1) |  | |
| B3 |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 2.211 | 2.031 | -8.14 | 6.89 | 2.302 | 4.12 | 9.55 |
|  | 55.28 | 54.57 | -1.28 | 7.52 | 54.74 | -0.98 | 3.28 |
|  | 621.94 | 649.82 | 4.49 | 2.31 | 655.80 | 5.45 | 5.56 |
| BD |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.501 | 1.493 | -0.56 | 5.47 | 1.638 | 9.13 | 6.74 |
|  | 37.54 | 34.67 | -7.64 | 2.98 | 38.68 | 3.03 | 2.59 |
|  | 422.28 | 423.30 | 0.28 | 7.14 | 419.70 | -0.57 | 8.93 |
| B7 |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.992 | 1.972 | -0.97 | 3.37 | 1.972 | -0.99 | 3.57 |
|  | 49.80 | 51.00 | 2.41 | 8.10 | 48.90 | -1.81 | 6.61 |
|  | 560.20 | 558.10 | -0.38 | 4.43 | 559.70 | -0.09 | 5.17 |
| B10 |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 0.8294 | 0.8426 | 1.59 | 2.51 | 0.7754 | -6.51 | 4.99 |
|  | 20.74 | 21.15 | 1.98 | 4.17 | 22.01 | 6.12 | 5.01 |
|  | 233.28 | 231.10 | -0.90 | 7.55 | 230.50 | -1.16 | 3.08 |
| B11 |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 0.6643 | 0.6533 | -1.66 | 5.72 | 0.6541 | -1.54 | 2.87 |
|  | 16.61 | 16.71 | 0.60 | 3.36 | 16.88 | 1.63 | 6.67 |
|  | 186.84 | 185.30 | -0.80 | 6.68 | 188.10 | 0.70 | 3.77 |

(ng·mL-1)

Measured concentration

Accuracy(%)

Precision(%, RSD)

Measured concentration

Accuracy(%)

Precision(%, RSD)

#### 5.2.3.4 提取回收率

如Table5- 4，白头翁皂苷B3，BD，B7, B10和B11 的平均提取回收率为71.17%～99.81%, RSD≤14.1%. 内标物质的平均提取回收率为(97.27±0.3558) %。

#### 5.2.3.5 基质效应

如Table5- 4，基质效应的均值为82.35% ~ 99.90%, RSD≤14.3%。表明在本方法的实验条件下，大鼠组织中的内源性物质对5 个被测化合物的离子化无明显影响。

Table 5- 4 Extraction recoveries and matrix effects of B3, BD, B7, B10 and B11for RRLC–MS/MS method (*n*=6)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Recovery(%) | RSD(%) | Recovery(%) | RSD(%) |
| B3  2.211 | 71.19 | 14.1 | 82.35 | 14.1 |
| 55.28 | 98.48 | 2.4 | 94.63 | 2.3 |
| 621.94 | 97.06 | 0.5 | 99.9 | 0.5 |
| BD |  |  |  |  |
| 1.501 | 95.95 | 12.0 | 87.65 | 12.0 |
| 37.54 | 99.81 | 0.5 | 99.42 | 0.5 |
| 422.28 | 98.63 | 0.2 | 97.54 | 0.2 |
| B7 |  |  |  |  |
| 1.992 | 92.31 | 13.3 | 85.71 | 14.3 |
| 49.80 | 99.20 | 1.2 | 99.6 | 1.3 |
| 560.20 | 97.80 | 0.2 | 96.67 | 0.2 |
| B10 |  |  |  |  |
| 0.8294 | 87.50 | 11.9 | 84.00 | 13.8 |
| 20.74 | 95.65 | 1.9 | 97.35 | 1.9 |
| 233.28 | 97.82 | 0.8 | 99.80 | 0.8 |
| B11 |  |  |  |  |
| 0.6643 | 93.94 | 9.4 | 96.88 | 9.4 |
| 16.61 | 99.03 | 1.9 | 99.03 | 1.8 |
| 186.84 | 95.79 | 0.4 | 95.21 | 0.4 |

Components Spiked (ng·mL-1)

Extraction recovery Matrix effects

#### 5.2.3.6 稳定性考察

实验结果的稳定性见Table5- 5。表明组织样品中的分析物质3 次冻融（RE:



−10.8% ~ 5.7%, RSD≤8.2%), 室温静置24 h (RE: −6.4% ~ 14.9%, RSD≤7.4%), 1 个

月内在-20℃环境(RE: −7.5% ~ 11.0%, RSD≤7.2%)的条件下稳定。RSD%≤10%, RE%的绝对值≤15%。

Table 5- 5 Stability for analysis of B3, BD, B7, B10 and B11 in rat tissue (*n*=6)

Three freeze–thaw cycles 24 h at room temperature 30 days at -20°C

Spiked

Components

Measured

RSD RE Measured

RSD RE Measured

RSD RE

(Ng·mL-1) Concentration(ng·mL-1) (%) (%) Concentration(ng·mL-1) (%) (%) Concentration(ng·mL-1) (%) (%)



|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| B3 |  | | | | | | | | | |
|  | 2.211 | 2.197 | 4.8 | 0 | 2.361 | 4.3 | 7.0 | 2.227 | 7.2 | 1.0 |
|  | 55.28 | 53.99 | 4.1 | -2.3 | 56.11 | 3.1 | 1.5 | 54.72 | 5.4 | -1.0 |
|  | 621.94 | 620.40 | 2.8 | -0.2 | 623.70 | 4.2 | 0.3 | 619.70 | 1.9 | -0.4 |
| BD |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.501 | 1.482 | 4.6 | -1.3 | 1.724 | 6.3 | 14.9 | 1.667 | 3.7 | 11.1 |
|  | 37.54 | 37.68 | 2.7 | 0.4 | 35.12 | 5.1 | -6.4 | 38.10 | 5 | 1.5 |
|  | 422.28 | 421.70 | 5.4 | -0.1 | 420.80 | 7.4 | -0.3 | 423.70 | 6.9 | 0.4 |
| B7 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.992 | 1.877 | 6.8 | -5.8 | 2.041 | 3.7 | 2.5 | 2.146 | 5.7 | 7.7 |
|  | 49.80 | 51.30 | 6.3 | 3.0 | 50.80 | 4.6 | 2.0 | 49.10 | 3.2 | -1.4 |
|  | 560.20 | 564.12 | 7.1 | 0.7 | 565.24 | 6.8 | 0.9 | 559.64 | 4.7 | -0.1 |
| B10 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 0.8294 | 0.8766 | 3.8 | 5.7 | 0.7930 | 3.2 | -4.4 | 0.7798 | 5.2 | -6.0 |
|  | 20.74 | 18.87 | 3.1 | -9.0 | 19.87 | 4.6 | -4.2 | 21.18 | 7.1 | 2.1 |
|  | 233.28 | 232.00 | 8.2 | -0.5 | 234.70 | 5.8 | 0.6 | 233.90 | 2.7 | 0.3 |
| B11 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 0.6643 | 0.6678 | 5.7 | 0.5 | 0.6527 | 3 | -1.7 | 0.6833 | 4.9 | 2.9 |
|  | 16.61 | 14.81 | 4.6 | -10.8 | 17.55 | 6.9 | 5.7 | 15.37 | 6.5 | -7.5 |
|  | 186.84 | 187.1 | 3.7 | 0.2 | 184.67 | 4.7 | -1.1 | 185.40 | 4.3 | -0.7 |

## 5.3 白头翁皂苷的大鼠组织分布研究

### 5.3.1 组织样品制备与测定

大鼠给药后，在不同时间点处死，取各组织，具体见“组织分布实验”，按照本章中“样品溶液的制备”中所描述的组织样品的制备和分析方法进行测定。



### 5.3.2 白头翁皂苷的组织分布

经过对灌胃300 mg·kg-1给药后大鼠组织的分析测定，计算不同时间点采集的各组织中白头翁皂苷的含量，见Table5- 6和Fig.5- 2。

Table5- 6 Mean contents of five pulchinenosides after single oral administration 300mg·kg-1 of PRS extract to rats,respectively ( mean ± S.D.)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| B3(ng·g-1) | 0.25h | 0.5h | 2h | 6h |
| Brain | 83.56±8.156 | 559.00±167.70 | 29.51±0.5937 | 2.942±0.2209 |
| Heart | 2858.48±265.85 | 2803.09±840.93 | 803.73±16.07 | 47.56±4.564 |
| Liver | 1929.03±38.58 | 2497.66±749.30 | 2018.63±40.37 | 38.01±3.100 |
| Spleen | 136.70±41.01 | 138.26±41.48 | 9.126±0.1825 | 10.45±1.044 |
| Lungs | 852.35±255.71 | 1657.68±497.3 | 134.86±2.697 | 47.49±3.949 |
| Kidney | 94.50±28.35 | 353.92±106.18 | 34.48±0.6895 | 2.575±0.2575 |
| Stomach | 106.75±32.03 | 276.44±82.93 | 52.12±1.042 | 28.83±2.282 |
| Small intestine | 441.21±22.06 | 581.32±174.40 | 223.79±4.476 | 66.30±6.629 |
| Large intestine | 246.57±12.33 | 408.48±122.54 | 21.22±0.4243 | 16.75±1.674 |
| Bladder | 228.01±11.40 | 359.41±107.82 | 94.22±1.884 | 42.26±3.626 |
| Pancreas | 32.38±1.618 | 45.70±13.71 | 43.60±0.8720 | 67.30±6.129 |
| Testis | 49.49±2.474 | 27.02±8.107 | 25.42±0.5083 | 2.921±0.2720 |
| Muscle | 150.43±7.521 | 300.15±90.04 | 86.34±1.726 | 61.67±6.167 |
| Fat | 149.08±7.454 | 192.47±57.74 | 109.45±2.189 | 72.46±7.246 |
|  |  |  |  |  |
| BD(ng·g-1) | 0.25h | 0.5h | 2h | 6h |
| Brain | 630.81±315.41 | 761.0±15.22 | 6.253±0.3126 | 19.77±1.877 |
| Heart | 1258.49±629.24 | 1701.24±34.02 | 399.93±19.99 | 50.71±4.071 |
| Liver | 985.15±492.58 | 1291.68±25.83 | 152.21±7.610 | 10.83±1.082 |
| Spleen | 354.39±177.19 | 450.65±9.012 | 15.07±0.7536 | 3.196±0.3196 |
| Lungs | 386.14±115.84 | 968.32±19.37 | 23.27±1.163 | 5.048±1.514 |
| Kidney | 741.12±222.34 | 479.05±143.71 | 41.30±0.8261 | 8.381±2.514 |
| Stomach | 65.20±19.56 | 269.00±80.70 | 58.97±1.179 | 41.69±12.51 |
| Small intestine | 130.41±39.12 | 538.00±161.40 | 117.94±2.359 | 83.38±25.01 |
| Large intestine | 63.80±19.14 | 102.90±30.87 | 5.297±0.115 | 3.915±1.172 |
| Bladder | 81.75±24.52 | 124.04±37.21 | 68.29±1.373 | 3.907±1.172 |
| Pancreas | 71.84±21.55 | 156.54±46.96 | 8.975±0.186 | 6.337±1.908 |



|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Testis  Muscle Fat | 98.60±29.58  72.72±21.82  139.03±41.71 | 116.84±35.05  139.06±41.72  208.03±62.41 | 30.75±0.624  75.12±1.503  128.66±2.574 | 11.11±3.335  40.82±12.25  32.09±9.635 |
|  |  |  |  |  |
| B7(ng·g-1) | 0.25h | 0.5h | 2h | 6h |
| Brain | 315.41±6.311 | 380.50±114.15 | 3.126±0.3127 | 9.386±0.4693 |
| Heart | 629.24±12.58 | 850.62±255.19 | 199.97±19.99 | 20.35±1.017 |
| Liver | 492.58±9.852 | 645.84±193.75 | 76.11±7.610 | 5.413±0.2707 |
| Spleen | 177.19±3.544 | 225.32±67.59 | 7.538±0.7537 | 1.598±0.07990 |
| Lungs | 193.07±3.861 | 484.16±145.25 | 11.64±1.163 | 2.524±0.1261 |
| Kidney | 370.56±7.411 | 239.52±71.86 | 20.65±2.065 | 4.190±0.2065 |
| Stomach | 32.60±0.65 | 134.50±67.25 | 29.49±8.854 | 20.84±0.4211 |
| Small intestine | 65.20±1.30 | 260.00±134.50 | 58.97±17.69 | 41.69±0.8325 |
| Large intestine | 55.83±1.12 | 90.04±45.02 | 4.633±1.392 | 3.422±0.07782 |
| Bladder | 115.28±2.318 | 108.53±54.27 | 59.75±17.93 | 3.451±0.07396 |
| Pancreas | 150.36±3.016 | 136.97±68.49 | 2.604±0.7833 | 5.543±0.1123 |
| Testis | 49.30±0.99 | 58.42±29.21 | 15.38±4.61 | 5.56±0.11 |
| Muscle | 68.18±1.368 | 119.77±59.88 | 18.78±5.638 | 10.20±0.2054 |
| Fat | 34.76±0.7067 | 52.01±26.04 | 32.16±9.652 | 8.027±0.1316 |
|  |  |  |  |  |
| B10(ng·g-1) | 0.25h | 0.5h | 2h | 6h |
| Brain | 39.65±3.865 | 96.71±4.835 | 35.93±3.593 | 13.22±0.2644 |
| Heart | 492.13±49.21 | 550.89±27.54 | 401.19±40.12 | 81.05±1.621 |
| Liver | 276.26±27.63 | 273.14±13.66 | 213.10±21.31 | 3.647±0.07294 |
| Spleen | 16.68±1.468 | 45.77±2.288 | 1.4537±0.1454 | 0.6337±0.01267 |
| Lungs | 81.45±8.145 | 105.43±5.271 | 20.76±10.38 | 11.58±3.987 |
| Kidney | 7.302±0.730 | 60.88±3.044 | 6.713±3.356 | 1.929±0.03858 |
| Stomach | 12.88±3.863 | 26.94±1.347 | 4.198±2.0990 | 1.299±0.02599 |
| Small intestine | 25.76±7.727 | 53.88±2.694 | 8.396±4.198 | 2.599±0.05199 |
| Large intestine | 29.05±8.716 | 39.62±11.89 | 7.489±3.744 | 3.761±0.1880 |
| Bladder | 27.16±8.149 | 39.04±11.71 | 18.96±9.479 | 16.19±0.8093 |
| Pancreas | 29.48±8.844 | 12.02±3.606 | 4.126±2.0632 | 9.568±0.4784 |
| Testis | 18.18±5.455 | 10.71±3.212 | 4.09±2.04 | 0.02787±0.01393 |



|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| B11(ng·g-1) | 0.25h | 0.5h | 2h | 6h |
| Brain | 67.56±8.456 | 361±89.1 | 92.51±0.6011 | 5.841±0.2341 |
| Heart | 947.48±35.86 | 803.09±840.94 | 245.73±16.095 | 65.56±4.656 |
| Liver | 878.03±79.33 | 378.66±78.31 | 192.63±58.38 | 25.10±3.201 |
| Spleen | 166.70±41.02 | 138.26±41.49 | 9.13±0.2025 | 10.45±1.145 |
| Lungs | 785.349±155.72 | 789.68±89.98 | 98.76±2.717 | 39.49±4.406 |
| Kidney | 95.87±39.67 | 458.89±98.09.19 | 38.76±0.987 | 3.57±0.89 |
| Stomach | 287.75±14.04 | 306.65±78.76 | 89.12±1.098 | 22.83±2.383 |
| Small intestine | 501.21±22.07 | 598.32±74.41 | 98.87±10.496 | 17.30±6.729 |
| Large intestine | 178.75±15.34 | 398.48±98.55 | 30.87±0.987 | 26.38±1.628 |
| Bladder | 187.67.01±11.78 | 298.41±89.83 | 89.78±19.043 | 36.26±3.726 |
| Pancreas | 47.56±1.669 | 55.89±13.72 | 76.09±0.8921 | 61.30±6.229 |
| Testis | 5949±2.525 | 37.02±8.407 | 17.42±0.528 | 2.721±0.3721 |
| Muscle | 180.44±7.572 | 298.15±90.05 | 87.34±1.74 | 81.67±6.267 |
| Fat | 134.08±7.504 | 98.47±57.75 | 98.58±2.208 | 35.89±8.889 |







Fig.5- 2 Mean contents of five pulchinenosides after single oral administration 300mg. kg-1 of PRS extract to rats, respectively ( mean±SD.)

## 5.4 讨论



### 5.4.1 白头翁皂苷在大鼠体内分布特征

药物分布速度决定药效产生的快慢，分布越迅速药效产生越快。由Table5- 6和Fig.5- 2可以看出，白头翁皂苷在动物体内的分布迅速且广泛，给药15 min后，各组织脏器中即可检测到较高水平的药物浓度。5 种皂苷在大部分组织器官中的达峰时间为

0.5 h，给药2 h后，白头翁皂苷的浓度逐渐下降，给药6 h后，药物基本消除，说明该类皂苷在体内不易蓄积。这与药物在血浆中的药动学行为相吻合，而给药后药物在胃和小肠中的浓度随时间下降的实验结果与口服给药方式有关。

给药后，5种白头翁皂苷主要分布在心脏，肝，肺，肾，小肠等器官，心脏中药物浓度最高。这与这些部位的血管丰富，血流量大密切相关，提示白头翁皂苷与这些脏器具有更高的组织亲和力，有利于这些脏器的肿瘤治疗，也可能使这些脏器成为毒性的靶器官。因此其结果对认识该药的疗效和毒性均有价值[2]。同时，小肠中的白头翁皂苷的分布高于大肠中，这与肠吸收实验结果相吻合，小肠中的十二指肠段是主要吸收部位。肾和膀胱的含量较低，提示尿液排泄不是药物排泄的主要途径。脂肪和肌肉等组织的分布较低，这一结论可能与脂肪组织中血管稀少有关。药物不易进入脂肪组织。

在动物脑中亦检测到白头翁皂苷的存在，说明白头翁皂苷可以通过血脑屏障。这与文献关于五环三萜类皂苷人参皂苷Rg1、桦木酸在脑组织中的分布报道相一致[3, 4]。

刘智宇等[5]对五环三萜类皂苷在动物脑中的分布进行综述，动物经肠外给予皂苷类成分多数可以透过血脑屏障。该类化合物虽不符合“five rules”[6]规则，仍能透过血脑屏障。提示白头翁皂苷类化合物可能具有较好的神经系统疾病的相关治疗作用。

### **5.4.2** 白头翁皂苷的组织靶向性

5种白头翁皂苷，根据苷元类型，B3和BD为常春藤皂苷元类皂苷，B7、B10和B11为齐墩果酸类皂苷，共属于五环三萜类皂苷，由于其3-位单糖链上所连接的糖基不同而不同。但由于基本母核结构相似，该类皂苷的组织分布结果显示了一定的特征性，肝脏和肺与白头翁五环三萜皂苷具有较高的亲和力，是其潜在的靶器官。课题组前期药效学实验显示白头翁皂苷体外对肝癌BEL-7402、肺癌A549两株细胞的生长抑制作用较其它细胞株更加显著，在体内对此两株细胞建立的动物移植瘤生长的影响也显示白头翁皂苷对肺癌和肝癌具有较好的抑制作用[7]。可见，PK的组织分布结果与前期抗肿瘤PD的实验结果相吻合，为白头翁皂苷作用机制的阐述提供依据。



参考文献

[1] 闫海霞. 鼠尾草酸在大鼠体内的药物动力学及代谢研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2005.

[2] Liu Y L, Song Y G, Xu Q M, et al. Validated rapid resolution LC-ESI–MS/MS method for simultaneous determination of five pulchinenosides fromPulsatilla chinensis (Bunge) Regel in rat plasma: Application to pharmacokinetics and bioavailability studies [J]. *J Chromatogra B*, 2013, 942-943: 141-150.

[3] Feng L, Wang L, Hu C, et al. Pharmacokinetics, Tissue Distri-bution, Metabolism, and Excretion of Ginsenoside Rg1 in Rats [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2010, 33(12): 1975-1984.

[4] Udeani G O, Zhao G M, Geun S Y, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid CD-1 mice [J]. *Biopharma Drug Disposit*, 1999, 20(8): 379-383.

*[5]* 刘智宇, 江蔚新, 吴斌. 皂苷类成分吸收分布和代谢及排泄研究进展[J]. 中国现代药物应用, 2012, 24(21): 106.

[6] Egan W J, Jauric G. Prediction of intestinal permeability [J]. *Adv Drug Rev*, 2002, 54(3): 273-289.

[7] Xu Q M, Shu Z, Yang S L, et al. Antitumor activity of Pulsatilla chinensis (Bunge) Regel saponins in human liver tumor 7402 cells in vitro and in vivo [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(3-4): 293- 300.



## 第六章 白头翁皂苷在大鼠体内的排泄研究

体内药物及其代谢物排出体外的过程称为排泄，它与生物转化统称为药物消除

[1]. 机体对药物的排泄与内源性物质的排泄方式基本相同，其排泄的器官有肾、肝、

胆、肠、肺及外分泌腺等[2]。研究药物的排泄有利于阐明药物的体内过程和变化。本文对白头翁皂苷在大鼠体内的排泄特征进行研究，主要研究白头翁皂苷在大鼠

胆汁、尿和粪中的排泄量及累积排泄率，了解其排泄特征，为新药开发和临床试验提供依据。

## 6.1 材料与试剂

### 6.1.1 仪器



同《白头翁皂苷在大鼠血浆中的药物动力学与绝对生物利用度研究》中“仪器”部分。

### 6.1.2 药品与试剂

白头翁皂苷制备和含量测定见《白头翁总皂苷的化学成分及其含量测定研究》部分，5种皂苷的标准品(B3, BD, B7, B10, B11)（纯度> 98%）制备同样见《白头翁总皂苷的化学成分及其含量测定研究》部分。

常春藤皂苷元和内标物质（IS）连翘苷见《白头翁皂苷在大鼠血浆中的药物动力学与绝对生物利用度研究》中“药品与试剂部分”。

试剂见《白头翁皂苷在大鼠血浆中的药物动力学与绝对生物利用度研究》中“药品与试剂部分”。

### 6.1.3 实验动物

见《白头翁皂苷在大鼠血浆中的药物动力学与绝对生物利用度研究》中“实验动物”部分。

### 6.1.4 口服用白头翁皂苷提取物

白头翁皂苷均匀混悬液制备见《白头翁皂苷在大鼠血浆中的药物动力学与绝对生物利用度研究》中“口服用白头翁和白头翁皂苷钠盐的制备”部分。

### 6.1.5 大鼠排泄实验

（1）胆汁排泄：大鼠6只，实验前禁食12 h，自由饮水。将大鼠用乙醚麻醉，仰位固定，行胆管插管引流术，收集给药前胆汁作为空白对照，待大鼠苏醒后一次性灌胃300 mg·mL-1白头翁皂苷，收集0 ~ 2 h，2 ~ 4 h，4 ~ 6 h，6 ~ 8h，8 ~ 12 h，12 ~ 14 h，14 ~ 16 h，16 ~ 18 h胆汁，记录体积，- 20℃保存。按建立的方法进行白头翁皂苷B3，BD，B7, B10和B11 的含量。

（2）尿粪排泄：大鼠6只置于代谢笼中，实验前禁食12h，自由饮水，收集给药前的尿和粪作为空白对照。一次性灌胃300 mg·kg-1白头翁皂苷，收集给药后0 ~ 2

H, 2 ~ 4 h, 4 ~ 6 h, 6~ 8 h, 8~ 12 h, 12 ~24h, 24 ~ 36 h, 36 ~ 48 h, 48 ~ 60 h，

60 ~ 84 h，84 ~ 96 h，96 ~ 108 h尿和粪。记录尿总体积后，- 20℃保存；各时间点



6.2 分析方法的建立与验证

**6.2.1** 标准溶液和样品的制备

**6.2.1.1** 储备液和对照品溶液的制备

精密称定标准物质溶解于甲醇中制成独立贮备液，B3 为 617 µg·mL-1，BD 为510 µg·mL-1，B7 为 819 µg·mL-1，B10 为 720 µg·mL-1，B11 为 519 µg·mL-1。临用前用甲醇按一定比例稀释为混合系列工作溶液，如 Table6- 1。4℃保存。

Table6- 1 Series of working solutions of five pulchinenosides

working

B3

BD

B7

B10

B11

收集的粪晾干后称重，用甲醇10 倍量制备匀浆。按建立的方法进行药物浓度测定。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| solutions/ng.ml-1 |  | | | | |
| 1 | 5.528 | 3.754 | 4.980 | 2.074 | 1.661 |
| 2 | 22.11 | 15.01 | 19.92 | 8.295 | 6.643 |
| 3 | 55.28 | 37.54 | 49.80 | 20.74 | 16.61 |
| 4 | 138.21 | 93.84 | 124.49 | 51.84 | 41.52 |
| 5 | 345.52 | 234.60 | 311.22 | 129.60 | 103.80 |
| 6 | 863.80 | 586.5 | 778.05 | 324.00 | 259.50 |
| 7 | 1727.60 | 1173.00 | 1556.10 | 648.00 | 519.00 |

#### 6.2.1.2 质控样品的制备

质控样品(QC)样品采用同样方法配制成含B3 (5.528,138.20,1554.75 ng·mL-1), BD (3.753,93.84,1055.25 ng·mL-1), B7 (4.980,124.50,1400.50 ng·mL-1), B10 (2.074,51.85,583.00 ng·mL-1), B11 (1.661,41.52,467.00 ng·mL-1)的系列溶液。

#### 6.2.1.3 内标溶液的制备

精密称取连翘苷对照品适量溶解于甲醇中，制成浓度为1.108 mg·mL-1.的储备液，临用时用甲醇配成浓度为1.108µg・mL-1的内标溶液，储存于4℃，备用。

#### 6.2.1.4 样品处理

在已建立的血药浓度分析方法的基础上[3]，建立不同的排泄物中药物浓度测定方法。取经过稀释方法学处理后的胆汁和尿、粪上清液50µL，加入10µL内标物质，20µL甲醇溶液，100µL乙腈，涡旋3 min，离心10 min(15,000 r·min-1)，取上清液

2µL进LC-MS仪分析。



### 6.2.2 分析方法的建立

#### 6.2.2.1 **LC-MS**条件

见《白头翁皂苷在大鼠血浆中的药物动力学与绝对生物利用度研究》中“色谱条件”部分。

#### 6.2.2.2 标准曲线的建立和最低定量限

取经过稀释方法学处理后的空白胆汁和尿、粪上清液50µL，加入10µL内标物质，20µL系列工作溶液，100µL乙腈，涡旋3 min，离心10 min(15,000 r·min-1)，取上清液2µL进LC-MS仪分析。

记录白头翁皂苷B3，BD，B7，B10, B11与内标的峰面积，并计算5种待测成分与内标的峰面积比。分别以上清液中各待测成分的浓度为横坐标，各待测成分与内标物的峰面积比值为纵坐标，以加权最小二乘法(W=l/χ2)回归绘制标准曲线。标准曲线的绘制采用7个浓度水平，每个浓度平行3份，重复3天测定。

LLOQ为连续测定6 份的准确度在实际浓度的80% ~ 120%之间，RSD小于

20%，信噪比大于5的浓度点，即为标准曲线上最低浓度点。

#### 6.2.2.3 精密度和准确度实验

取经过稀释方法学处理后的空白胆汁和尿、粪上清液50µL，加入10µL内标物质，20µL甲醇溶液，100µL乙腈，涡旋3 min，离心10 min (15,000 r·min-1)，取上

清液2µL进LC-MS仪分析。每个浓度制备6份，每个浓度连续进样6次，测定日内精密度。重复操作，连续测定3天并随行标准曲线，计算日间精密度。准确度通过样品的测定浓度与理论浓度的符合程度来评价，用相对回收率和相对误差来表示。

#### 6.2.2.4 提取回收率实验

取经过稀释方法学处理后的空白胆汁和尿、粪上清液各50µL，加入10µL内标物质，20µL高、中、低浓度质控溶液，100µL乙腈，N2吹干，100µL甲醇复溶，涡旋3 min，离心10 min (15,000r·min-1)，取上清2µL进LC-MS仪分析，记录各待测化合物经提取后得到峰面积(A1)。另取6个不同来源的大鼠空白胆汁和尿、粪上清液各50µL，100µL乙腈，N2吹干，加入10µL内标物质，20µL高、中、低浓度质控溶液和70µL甲醇复溶，涡旋3 min，离心10 min (15,000 r·min-1)，取上清2µL进LC-MS仪分析，记录未经提取直接进样获得的色谱峰面积(A2)，计算提取回收率(A1/A2×100%)。内标物质同法测定。要求提取回收率≥70%。



#### 6.2.2.5 基质效应实验

取经过稀释方法学处理后的6个不同来源的大鼠空白胆汁上清液各50µL, 100

µL乙腈，N2吹干，加入10µL内标物质，20µL高、中、低浓度质控溶液和70µL

甲醇复溶，涡旋3 min，离心10 min (15,000 r·min-1)，取上清2µL进LC-MS仪分

析，分别记录5个待测化合物和内标的峰面积，计算5个待测化合物和内标的峰面积比值(A1)。另精密吸取10µL内标溶液与20µL高、中、低浓度质控溶液混匀，加入蒸馏水100µL代替空白胆汁上清液，100µL乙腈，氮吹干，100µL甲醇复溶，涡旋3 min，离心10 min (15,000 r·min-1)，取上清液2µL进LC-MS仪分析，每浓度

6份样品。分别记录5个待测化合物和内标的峰面积，计算5个待测化合物和内标的峰面积比值(A2)。求各浓度下5个待测化合物的回收率(A1/A2×100%)，计算基质效应。

尿和粪的基质效应同法求算。

#### 6.2.2.6 稳定性实验

质控样品稳定性评价为待测物样品置于-20°C环境中1月，循环冷冻(-20°C)

和溶解（室温）3次，以及室温24 h放置的稳定性。

#### 6.2.2.7 胆汁和粪稀释方法学

取空白胆汁并精密加入含B3为617µg·mL-1，BD为510µg·mL-1，B7为819

µg·mL-1, B10为720µg·mL-1, B11为519µg·mL-1的独立储备液，使成含B3 17.28

µg・mL-1, BD 11.73µg・mL-1, B7 15.56µg・mL-1, B10 6.480µg・mL-1, B11 5.190µg・mL-1的样品，精密吸取该样品以空白胆汁稀释20倍，得含B3 863.80 ng·mL-1, BD 586.50 ng·mL-1, B7 778.05ng·mL-1, B10 324.00 ng·mL-1, B11 259.50 ng·mL-1的样品5份。上述样品按“胆汁样品溶液制备”相同处理后进样，由标准曲线求算出各样品的浓度，将测得的浓度与已知加入的浓度相比，考察用空白胆汁稀释样品的准确性和可行性。

取空白粪样上清并精密加入含B3为617µg・mL-1，BD为510µg・mL-1，B7 为

819µg·mL-1, B10为720µg·mL-1, B11为519µg·mL-1的独立储备液，使成含B3

43.19µg·mL-1, BD 29.32µg·mL-1, B7 38.90µg·mL-1, B10 16.20µg·mL-1, B11 12.98



µg·mL-1的样品，精密吸取该样品以空白粪样稀释50倍，得含B3 863.80 ng·mL-1, BD 586.50 ng·mL-1, B7 778.05 ng·mL-1, B10 324.00 ng·mL-1, B11 259.50 ng·mL-1的样品 5

份。上述样品按“粪样品溶液制备方法”相同处理后进样，由标准曲线求算出各样品的浓度，将测得的浓度与已知加入的浓度相比，考察用空白粪样稀释样品的准确性和可行性。

超过标准曲线最高定量限的样品可用空白胆汁或空白粪样稀释后进行测定。

### 6.2.3 方法学验证结果分析

#### 6.2.3.1 方法专属性

在确定的LC-MS条件下，5个白头翁皂苷和内标物质的MRM检测具有较高选择性，色谱峰良好，内源性物质无干扰。典型色谱图如Fig.6- 1。



**a: Bile Blank** c:4-6h Bile **Sample**

**yt**

**hin**

**f**

**ors**

**B**

**D**

B10 B7

B10

**B: Blank urine spiked** **c:24-36h urine sample**

**forsythin**



**B3**

**B**

**D**

B10

**1**

**B1**

C: Feces

**A: Feces blank** b: Blank **feces spiked** **c:12-24h feces sample**

**t**

**hi**

**n**



**f**

**or**

**sy**



**B**

**3**

**BD**

**B1**

7

**B7**

**+**

**0**

B



Fig.6- 1 Representative extract ion MRM chromatograms of forsythin(IS), five pulchinenosides, A:(a) blank bile, (b) blank bile spiked with the five analytes at LLOQ and IS, (c) 4-6 h bile sample after a single oral administration of PRS extract to rats; B:(a) blank urine, (b) blank urine spiked with the five analytes at LLOQ and IS, (c) 24-36h urine sample after a single oral administration of PRS extract to rats; C:(a) blank feces, (b) blank feces spiked with the five analytes at LLOQ and IS, (c) 12-24h feces sample after a single oral administration of PRS extract to rats

#### 6.2.3.2 线性范围和最低定量限

分析物质的线性范围、回归方程和相关系数见Table6- 2. 标准曲线范围满足排泄样品的浓度要求，5个分析样品在2.211-691.04 ng·mL-1 (B3), 1.501-469.20 ng·mL-1 (BD), 1.992-622.44 ng·mL-1 (B7), 0.8294-259.20 ng·mL-1 (B10), 0.6643-207.60 ng·mL-1

（B11） 的范围内线性较好，*r2*> 0.99.



B3，BD，B7，B10 和 B11 的最低定量限和变异系数见 Table6- 3。

Table6- 3 The LLOQ of Muti-components determined

coefficient(%)

urine

5.21

9.64

5.57

3.98

9.19

feces

8.26

11.37

6.99

5.13

6.39

Table 6- 2 Regression data of the multi-components determined. (a: bile; b: urine; c: feces) a: Bile

| Components | Linear range (ng·mL-1) | Linear regression equation | Correlation coefficient (r2) |
| --- | --- | --- | --- |
| B3 | 2.211-691.04 | y=0.032x-0.0087 | 0.9925 |
| BD | 1.501-469.20 | y=0.0105x+0.0068 | 0.9947 |
| B7 | 1.992-622.44 | y=0.0061x-0.0031 | 0.9967 |
| B10 | 0.8296-259.2 | y=0.0046x-0.0032 | 0.9942 |
| B11 | 0.6644-207.60 | y=95.710x-0.6234 | 0.9946 |
| B :Urine |  |  |  |
| Components | Linear range (ng·mL-1) | Linear regression equation | Correlation coefficient (r2) |
| B3 | 2.211-691.04 | y=0.0068+0.0016 | 0.9984 |
| BD | 1.501-469.20 | y=0.0415x+0.0453 | 0.9953 |
| B7 | 1.992-622.44 | y=0.0113x+0.0177 | 0.9975 |
| B10 | 0.8296-259.20 | y=0.0093x+0.0075 | 0.9935 |
| B11 | 0.6644-207.60 | y=0.0288x+0.0105 | 0.9958 |
| C :Feces |  |  |  |
| Components | Linear range (ng·mL-1) | Linear regression equation | Correlation coefficient (r2) |
| B3 | 2.211-691.04 | y=0.0069x-0.00236 | 0.9955 |
| BD | 1.501-469.20 | y=0.0221x+0.0118 | 0.9991 |
| B7 | 1.992-622.44 | y=0.0106x+0.0085 | 0.9940 |
| B10 | 0.8296-259.20 | y=0.0062x+0.0040 | 0.9989 |
| B11 | 0.6644-207.60 | y=0.0188x+0.0054 | 0.9979 |

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| components |  | B3 | BD | B7 | B10 | B11 |
| LLOQ/ng·mL-1 |  | 2.211 | 1.501 | 1.992 | 0.8296 | 0.6644 |
| Variation | bile | 6.32 | 10.16 | 8.64 | 8.24 | 7.72 |

#### 6.2.3.3 准确度和精密度

方法精密度和准确度见Table6- 4. 胆汁准确度为-6.80% ~ 8.66% 和-6.88% ~

15.05%，日内和日间精密度分别为2.04% ~ 7.69% 和2.94% ~ 8.37%；尿中准确度为

-15.44% ~ 13.99%和-7.60% ~ 9.87%，日内和日间精密度分别为2.51% ~ 9.58% 和

2.29% ~ 8.75%；粪中准确度为-13.93% ~ 7.27%和-14.72% ~ 16.07%，日内和日间

精密度分别为2.33% ~ 8.68%和2.09% ~ 9.01%。

Table 6- 4 Accuracies and precisions of B3, BD, B7, B10 and B11for RRLC–MS/MS method (*n*=6)(a: bile; b: urine; c: feces)

a: Bile

Components Spiked Intra-day(n=3) Inter-day(n=6)

bile **(**ng·mL-1**)**

Measured concentration

Precision(%,

Accuracy(%)

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | (ng·mL-1) |  |  | (ng·mL-1) |  | |
| B3 |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 2.211 | 2.194 | -0.77 | 4.19 | 2.228 | 0.77 | 7.69 |
|  | 55.28 | 54.03 | -2.26 | 3.11 | 57.11 | 3.31 | 4.68 |
|  | 621.90 | 622.10 | 0.03 | 5.17 | 618.90 | -0.48 | 4.03 |
| BD |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.501 | 1.399 | -6.80 | 2.04 | 1.652 | 10.06 | 7.24 |
|  | 37.54 | 36.92 | -1.63 | 6.97 | 37.24 | -0.78 | 4.03 |
|  | 422.10 | 419.80 | -0.55 | 4.19 | 425.30 | 0.76 | 2.94 |
| B7 |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.992 | 2.116 | 6.22 | 5.36 | 1.855 | -6.89 | 3.46 |
|  | 49.80 | 50.70 | 1.81 | 4.01 | 51.60 | 3.61 | 5.56 |
|  | 560.20 | 559.30 | -0.16 | 5.38 | 561.30 | 0.20 | 8.04 |
| B10 |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 0.8294 | 0.9012 | 8.66 | 2.96 | 0.9542 | 15.05 | 7.35 |
|  | 20.74 | 21.56 | 3.95 | 5.73 | 20.36 | -1.83 | 3.24 |
|  | 233.20 | 234.70 | 0.64 | 4.32 | 235.70 | 1.07 | 8.17 |
| B11 |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 0.6643 | 0.6489 | -2.32 | 7.69 | 0.6951 | 4.64 | 3.85 |
|  | 16.61 | 15.56 | -6.32 | 3.31 | 15.94 | -4.03 | 8.37 |
|  | 186.80 | 188.10 | 0.70 | 4.16 | 188.30 | 0.80 | 3.57 |

RSD)

Measured concentration



Precision(%,

Accuracy(%)

RSD)

b: Urine

Components Spiked Intra-day(n=3) Inter-day(n=6)

urine **(**ng·mL-1**)**

Measured concentration

Precision(%,

Accuracy(%)

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | (ng·mL-1) |  |  | (ng·mL-1) |  | |
| B3 |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 2.211 | 2.458 | 11.17 | 7.35 | 2.259 | 2.17 | 8.75 |
|  | 55.28 | 57.35 | 3.75 | 9.58 | 56.26 | 1.77 | 2.91 |
|  | 621.90 | 615.20 | -1.08 | 4.97 | 609.10 | -2.06 | 3.6 |
| BD |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.501 | 1.711 | 13.99 | 6.69 | 1.387 | -7.60 | 8.36 |
|  | 37.54 | 35.24 | -6.10 | 3.17 | 39.15 | 4.31 | 2.29 |
|  | 422.10 | 420.60 | -0.36 | 9.31 | 424.30 | 0.52 | 4.72 |
| B7 |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.992 | 1.6843 | -15.44 | 5.14 | 2.158 | 8.36 | 2.98 |
|  | 49.80 | 48.30 | -3.01 | 8.11 | 50.70 | 1.81 | 4.66 |
|  | 560.20 | 558.10 | -0.38 | 2.51 | 562.40 | 0.39 | 5.32 |
| B10 |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 0.8294 | 0.7996 | -3.59 | 7.04 | 0.8451 | 1.89 | 5.61 |
|  | 20.74 | 18.25 | -12.01 | 2.98 | 21.56 | 3.95 | 4.67 |
|  | 233.20 | 230.90 | -0.99 | 7.95 | 235.50 | 0.99 | 2.92 |
| B11 |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 0.6643 | 0.6447 | -2.95 | 4.36 | 0.6851 | 3.13 | 6.89 |
|  | 16.61 | 16.58 | -0.18 | 6.51 | 18.25 | 9.87 | 8.31 |
|  | 186.80 | 185.90 | -0.48 | 2.99 | 188.70 | 1.02 | 2.81 |
| c:Feces | | | | | | | |
| Components | Spiked | Intra-day(n=3) | | Inter-day(n=6) | | | |

RSD)

Measured concentration

Precision(%,

Accuracy(%)

RSD)



feces **(**ng·mL-1**)**

Measured concentration

Precision(%,

Accuracy(%)

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | (ng·mL-1**)** |  |  | (ng·mL-1) |  | |
| B3 | 2.211 | 1.995 | -9.77 | 6.03 | 1.997 | -9.68 | 8.79 |
|  | 55.28 | 56.52 | 2.24 | 3.44 | 56.45 | 2.12 | 2.47 |
|  | 621.90 | 618.80 | -0.50 | 2.61 | 619.50 | -0.39 | 6.87 |

RSD)

Measured concentration

Precision(%,

Accuracy(%)

RSD)

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| BD |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.501 | 1.447 | -3.60 | 3.17 | 1.485 | -1.07 | 7.86 |
|  | 37.54 | 40.26 | 7.27 | 8.56 | 35.27 | -6.02 | 5.73 |
|  | 422.10 | 420.60 | -0.36 | 3.46 | 359.98 | -14.72 | 8.25 |
| B7 |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.992 | 1.988 | -0.21 | 2.33 | 1.975 | -0.83 | 7.91 |
|  | 49.80 | 51.10 | 2.61 | 7.01 | 51.70 | 3.82 | 3.85 |
|  | 560.20 | 561.40 | 0.21 | 7.64 | 559.50 | -0.12 | 7.89 |
| B10 |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 0.8294 | 0.8441 | 1.77 | 3.57 | 0.9627 | 16.07 | 5.88 |
|  | 20.74 | 17.85 | -13.93 | 3.32 | 21.63 | 4.29 | 3.38 |
|  | 233.20 | 230.70 | -1.07 | 7.02 | 233.80 | 0.26 | 7.28 |
| B11 |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 0.6643 | 0.6451 | -2.89 | 5.46 | 0.6428 | -3.24 | 6.76 |
|  | 16.61 | 14.99 | -9.75 | 6.61 | 15.95 | -3.97 | 9.01 |
|  | 186.80 | 189.70 | 1.55 | 8.68 | 185.70 | -0.59 | 2.09 |

#### 6.2.3.4

提取回收率

如Table6-5，胆汁中白头翁皂苷B3、BD、B7、B10和B11的平均提取回收率为81.25% ~ 99.59%, RSD≤9.259%，胆汁中内标物质的平均提取回收率为(90.21±0.4756) %；尿中白头翁皂苷B3、BD、B7、B10和B11 的平均提取回收率为80.67%

~ 99.16%, RSD≤9.061%，尿中内标物质的平均提取回收率为(88.89±1.402) %；粪中白头翁皂苷B3、BD、B7、B10和B11的平均提取回收率为80.95% ~ 98.71%, RSD≤9.655%，粪中内标物质的平均提取回收率为(93.74±0.7205) %。

#### 6.2.3.5 基质效应

基质效应结果如Table6-5，胆汁中基质效应的均值为85.63% ~ 99.93%, RSD≤9.213%；尿中基质效应的均值为77.77% ~ 99.65%, RSD≤8.947%；粪中基质效应的均值为86.11% ~ 99.91%, RSD≤9.545%。表明在本方法的实验条件下，大鼠排泄物中的内源性物质对5 个被测化合物的离子化无明显影响。



b:Urine

Components

Spiked

Extraction recovery

Matrix effects

Table 6- 5 Extraction recoveries and matrix effects of B3, BD, B7, B10 and B11for RRLC–MS/MS method (*n*=6) (a: bile; b: urine; c: feces)

a: Bile

Components Spiked Extraction recovery Matrix effects

| Bile | (ng·mL-1) | Recovery(%) | RSD(%) | Recovery(%) | RSD(%) |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| B3 |  |  |  |  |  |
|  | 2.211 | 84.85 | 8.2 | 93.11 | 8.9 |
|  | 55.28 | 98.23 | 1.0 | 99.64 | 1.0 |
|  | 621.90 | 95.96 | 0.2 | 99.93 | 0.2 |
| BD |  |  |  |  |  |
|  | 1.501 | 88.44 | 1.9 | 99.24 | 2.0 |
|  | 37.54 | 97.39 | 0.7 | 98.91 | 0.8 |
|  | 422.10 | 98.54 | 0.1 | 99.85 | 0.1 |
| B7 |  |  |  |  |  |
|  | 1.992 | 82.98 | 7.9 | 95.34 | 8.3 |
|  | 49.80 | 97.18 | 1.7 | 98.56 | 1.7 |
|  | 560.20 | 99.59 | 1.1 | 99.79 | 1.1 |
| B10 |  |  |  |  |  |
|  | 0.8294 | 82.35 | 8.8 | 93.75 | 8.7 |
|  | 20.74 | 81.25 | 1.7 | 96.67 | 1.8 |
|  | 233.20 | 86.26 | 2.9 | 85.63 | 3.0 |
| B11 |  |  |  |  |  |
|  | 0.6643 | 88.89 | 9.3 | 96.15 | 9.2 |
|  | 16.61 | 93.94 | 1.5 | 98.23 | 1.5 |
|  | 186.80 | 91.38 | 2.2 | 94.62 | 2.1 |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Urile | (ng·mL-1) | Recovery(%) | RSD(%) | Recovery(%) | RSD(%) |
| B3 |  |  |  |  |  |
|  | 2.211 | 94.92 | 7.1 | 96.49 | 8.9 |
|  | 55.28 | 94.61 | 2.1 | 92.7 | 2.8 |
|  | 621.90 | 94.77 | 0.1 | 97.83 | 1.2 |
| BD |  |  |  |  |  |



c:Feces

Components

Spiked

Extraction recovery

Matrix effects

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1.501 | 91.45 | 4.5 | 95.41 | 5.1 |
|  | 37.54 | 97.15 | 0.7 | 99.3 | 0.7 |
|  | 422.10 | 96.44 | 0.0 | 99.65 | 0.0 |
| B7 |  |  |  |  |  |
|  | 1.992 | 88.89 | 9.1 | 97.06 | 3.3 |
|  | 49.80 | 97.82 | 2.1 | 93.8 | 2.2 |
|  | 560.20 | 99.16 | 0.2 | 87.34 | 0.2 |
| B10 |  |  |  |  |  |
|  | 0.8294 | 80.67 | 8.1 | 83.33 | 6.3 |
|  | 20.74 | 96.22 | 5.1 | 93.9 | 4.8 |
|  | 233.20 | 93.41 | 3.2 | 96.55 | 3.0 |
| B11 |  |  |  |  |  |
|  | 0.6643 | 85.71 | 5.8 | 77.77 | 2.2 |
|  | 16.61 | 98.17 | 1.1 | 99.07 | 1.2 |
|  | 186.80 | 97.53 | 0.1 | 99.58 | 0.1 |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Feces | (ng·mL-1) | Recovery(%) | RSD(%) | Recovery(%) | RSD(%) |
| B3 |  |  |  |  |  |
|  | 2.211 | 83.33 | 8.4 | 88.89 | 9.2 |
|  | 55.28 | 96.52 | 1.7 | 97.22 | 1.6 |
|  | 621.90 | 98.71 | 0.3 | 99.83 | 0.3 |
| BD |  |  |  |  |  |
|  | 1.501 | 82.02 | 3.0 | 93.75 | 2.8 |
|  | 37.54 | 95.77 | 1.1 | 99.27 | 1.0 |
|  | 422.10 | 97.64 | 0.0 | 99.04 | 0.0 |
| B7 |  |  |  |  |  |
|  | 1.992 | 83.56 | 8.7 | 86.11 | 8.2 |
|  | 49.80 | 97.04 | 1.8 | 99.39 | 1.7 |
|  | 560.20 | 96.73 | 0.2 | 99.91 | 0.2 |
| B10 |  |  |  |  |  |
|  | 0.8294 | 80.95 | 9.6 | 94.74 | 8.9 |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 20.74 | 84.78 | 4.0 | 96.72 | 4.1 |
|  | 233.20 | 98.4 | 0.9 | 98.16 | 0.9 |
| B11 |  |  |  |  |  |
|  | 0.6643 | 87.5 | 9.7 | 88 | 9.5 |
|  | 16.61 | 93.48 | 1.3 | 96.86 | 1.4 |
|  | 186.80 | 93.75 | 0.3 | 96.82 | 0.3 |

#### 6.2.3.6 稳定性考察

实验结果的稳定性见Table6- 6. 表明胆汁中的分析物质3次冻融(RE: -5.528% ~ 9.211%, RSD≤7.104 %)，室温静置24 h (RE: -11.471% ~ 5.714%, RSD≤8.436 %)，1 个



(RE:-6.929 % ~ 9.45%, RSD ≤ 9.657 %)，1 个月内在 -20℃环境 (RE: -16.876% ~

3.686%, RSD ≤ 8.991 %) 的条件下稳定；粪中的分析物质 3 次冻融 (RE:-10.206 % ~

11.759%, RSD ≤ 7.881 %)，再室温静置 24 h (RE:-10.029 % ~ 19.653%, RSD ≤ 9.789% )，

1 个月内在-20 ℃环境 (RE:-9.12 % ~ 12.901%, RSD ≤ 9.768 %) 的条件下稳定。

Table6- 6 Stability for analysis of B3, BD, B7, B10 and B11 in rat excretion (n=6),(a:bile;b:urine;c:feces)

a:Bile

Three freeze–thaw cycles

24 h at room temperature

30 days at -20 °C

Components Spiked

Measured

RSD RE

Measured

RSD RE

Measured

RSD RE

(Bile)

(ng·mL-1) Concentration(ng·mL-1) (%) (%) Concentration(ng·mL-1) (%) (%) Concentration(ng·mL-1) (%) (%)

月内在-20℃环境(RE: -6.422% ~ 7.09%, RSD≤8.547 %)的条件下稳定；尿中的分析物质3 次冻融(RE: -16.649 % ~ 12.059%, RSD ≤ 8.547 %)，再室温静置24 h

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| B3 |  | | | | | | | |
|  | 2.211 | 2.378 | 6.8 7.6 | 2.177 | 4 | -1.5 | 2.069 | 8.2 -6.4 |
|  | 55.28 | 53.97 | 5.3 -2.4 | 54.62 | 6.3 | -1.2 | 56.11 | 3.1 1.5 |
|  | 621.90 | 617.80 | 3.4 -0.7 | 623.40 | 4.1 | 0.2 | 619.60 | 2.8 -0.4 |
| BD |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.501 | 1.552 | 3.2 3.4 | 1.398 | 4.7 | -6.9 | 1.472 | 3.8 -1.9 |
|  | 37.54 | 35.46 | 4.7 -5.5 | 35.70 | 2.6 | -4.9 | 37.94 | 3 1.1 |
|  | 422.10 | 419.70 | 6.1 -0.6 | 420.60 | 5.1 | -0.4 | 423.80 | 3.7 0.4 |
| B7 |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.992 | 1.996 | 5.2 0.2 | 1.998 | 4.3 | 0.3 | 2.010 | 4.6 0.9 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 49.80 | 50.10 | 2.8 | 0.6 | 48.70 | 6.1 -2.2 | 50.40 | 7.1 1.2 |
| B10 | 560.20  0.8294 | 564.68  0.8962 | 5.7  5.4 | 0.8  8.1 | 577.01  0.7934 | 3 5.7  7.9 -11.5 | 565.24  0.7785 | 4.9 0.9  5.8 -6.1 |
|  | 20.74 | 20.88 | 3 | 0.7 | 21.09 | 7.4 1.7 | 19.87 | 4.7 -4.2 |
|  | 233.20 | 230.80 | 7.1 | -1 | 234.40 | 5.9 0.5 | 239.50 | 8.5 2.7 |
| B11 | 0.6643 | 0.6521 | 6.5 | -1.8 | 0.5933 | 7.3 -10.7 | 0.7110 | 5.3 7.1 |
|  | 16.61 | 18.14 | 2.4 | 9.2 | 14.99 | 8.4 -9.8 | 16.55 | 6.8 -0.4 |
|  | 186.80 | 179.90 | 5.3 | -3.7 | 179.30 | 5.8 -4 | 187.60 | 6.1 0.4 |

b: Urine

Three freeze–thaw cycles 24 h at room temperature 30 days at -20°C



Components Spiked

Measured

RSD RE Measured

RSD RE Measured

RSD RE

(Urine) (ng·mL-1) Concentration(ng·mL-1) (%) (%) Concentration(ng·mL-1) (%) (%) Concentration(ng·mL-1) (%) (%)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| B3 |  | | | | | | | | | |
|  | 2.211 | 2.447 | 4.1 | 11 | 2.138 | 4.6 | -3.3 | 2.234 | 2.7 | 1 |
|  | 55.28 | 54.01 | 4.6 | -2.3 | 56.92 | 3.3 | 3 | 54.17 | 5.2 | -2 |
|  | 621.90 | 620.70 | 6.3 | -0.2 | 622.40 | 8.7 | 0.1 | 618.90 | 6.8 | -0.5 |
| BD |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.501 | 1.682 | 3 | 12.1 | 1.397 | 4.6 | -6.9 | 1.744 | 6.3 | 3.7 |
|  | 37.54 | 36.64 | 6 | -2.4 | 35.71 | 7.5 | -4.9 | 38.57 | 4.4 | 2.8 |
|  | 422.10 | 420.80 | 5.8 | -0.3 | 419.70 | 8.5 | -0.6 | 421.50 | 9 | -0.1 |
| B7 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.992 | 2.027 | 6.3 | 1.8 | 1.923 | 5.2 | -3.4 | 1.957 | 4.6 | -1.7 |
|  | 49.80 | 49.90 | 7.4 | 0.2 | 47.70 | 9.7 | -4.2 | 50.70 | 8.5 | 1.8 |
|  | 560.20 | 570.28 | 5.7 | 1.8 | 565.24 | 6.3 | 0.9 | 558.52 | 5.4 | -0.3 |
| B10 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 0.8294 | 0.7997 | 5.7 | -3.6 | 0.8477 | 9.3 | 2.2 | 0.7955 | 7.1 | -4.1 |
|  | 20.74 | 18.19 | 6.8 | -12.3 | 22.70 | 5.8 | 9.5 | 17.24 | 5.4 | -16.9 |
|  | 233.20 | 230.90 | 4 | -1 | 233.60 | 7.9 | 0.2 | 234.70 | 6.1 | 0.6 |
| B11 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 0.6643 | 0.5537 | 6.4 | -16.6 | 0.6488 | 6 | -2.3 | 0.6741 | 4.8 | 1.5 |
|  | 16.61 | 16.87 | 8.5 | 1.6 | 16.09 | 7.1 | -3.1 | 17.14 | 3.7 | 3.2 |
|  | 186.80 | 186.90 | 7 | 0.1 | 187.48 | 6 | 0.4 | 177.60 | 6.8 | -4.9 |

c: Feces

Three freeze–thaw cycles 24 h at room temperature 30 days at -20°C

Components Spiked

Measured

RSD RE Measured

RSD RE Measured

RSD RE

feces (ng·mL-1) Concentration(ng·mL-1) (%) (%) Concentration(ng·mL-1) (%) (%) Concentration(ng·mL-1) (%) (%)



|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| B3 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 2.211 | 2.471 | 7.3 | 11.8 | 2.177 | 4.8 | -1.5 | 2.097 | 2.1 | -5.2 |
|  | 55.28 | 55.74 | 4.6 | 0.8 | 56.98 | 2.4 | 3.1 | 54.17 | 5.2 | -2 |
|  | 621.90 | 617.50 | 5.2 | -0.7 | 619.40 | 9.8 | -0.4 | 622.10 | 9.8 | 0 |
| BD |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.501 | 1.557 | 6.9 | 3.7 | 1.387 | 4.2 | -7.6 | 1.415 | 9.1 | -9.1 |
|  | 37.54 | 36.14 | 7.9 | -3.7 | 38.46 | 4 | 2.5 | 38.73 | 6.4 | 3.2 |
|  | 422.10 | 423.30 | 7 | 0.3 | 431.80 | 6.6 | 2.3 | 419.70 | 4.7 | -0.6 |
| B7 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 1.992 | 1.854 | 6 | -6.9 | 1.875 | 3.1 | -5.9 | 1.863 | 7.4 | -6.5 |
|  | 49.80 | 50.10 | 2.7 | 0.6 | 47.70 | 8 | -4.2 | 51.60 | 5.2 | 3.6 |
|  | 560.20 | 559.64 | 5.1 | -0.1 | 556.84 | 3.1 | -0.6 | 570.28 | 3.6 | 1.8 |
| B10 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 0.8294 | 0.7842 | 5.3 | -5.5 | 0.9924 | 4.3 | 19.7 | 0.9364 | 8.5 | 12.9 |
|  | 20.74 | 23.17 | 7 | 11.7 | 18.66 | 8.7 | -10 | 19.25 | 6.8 | -7.2 |
|  | 233.20 | 209.40 | 4.6 | -10.2 | 223.70 | 3.6 | -4.1 | 233.80 | 2.4 | 0.3 |
| B11 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | 0.6643 | 0.6185 | 4.2 | -6.9 | 0.7235 | 2.1 | 8.9 | 0.6187 | 4.9 | -6.9 |
|  | 16.61 | 16.99 | 2.8 | 2.3 | 17.24 | 4 | 3.8 | 15.87 | 3.7 | -4.5 |
|  | 186.80 | 188.20 | 3.4 | 0.7 | 188.10 | 5.8 | 0.7 | 185.30 | 4.6 | -0.8 |

#### 6.2.3.7 稀释方法学

结果见Table6-7，可见胆汁稀释20倍后，准确度为94.94% ~ 99.04%，精密度分别为3.983% ~ 10.63%；粪上清液稀释50倍后，准确度为95.71% ~ 97.91%，精密度分别为4.238% ~ 11.34%。测定结果准确，超过标准曲线最高定量限的样品可用空白胆汁或者空白粪上清稀释后进行测定。

Table 6- 7 The verification of dilution methods (n=6)

bile feces

Spiked

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | (ng·mL-1) | -1 | (%) | (%, RSD) | -1 | (%) | (%, RSD) |
| B3 | 863.80 | 855.54 | -1.0 | 7.7 | 836.37 | -3.2 | 4.2 |
| BD | 586.50 | 567.63 | -3.2 | 6.9 | 561.31 | -4.3 | 5.8 |
| B7 | 778.05 | 767.31 | -1.4 | 4.0 | 753.17 | -3.2 | 11.3 |
| B10 | 324.00 | 317.14 | -2.1 | 8.3 | 317.24 | -2.1 | 6.8 |
| B11 | 259.50 | 246.37 | -5.1 | 10.6 | 251.34 | -3.1 | 7.8 |

Components

Measured Concentration (ng·mL )

Accuracy Precision Measured

Concentration (ng·mL )

Accuracy Precision

## 6.3 白头翁皂苷的大鼠排泄研究

### 6.3.1 排泄样品的制备与测定



大鼠给药后，按“大鼠排泄实验”收集排泄物，按照本章中“样品溶液的制备”中所描述的胆汁、尿、粪的制备和分析方法进行测定。

### 6.3.2 白头翁皂苷的排泄

经过对灌胃300 mg·kg-1给药后大鼠排泄物的分析测定，计算排泄物中白头翁皂苷的量及排泄比率。

#### 6.3.2.1 胆汁排泄

Table 6- 8 Mean and cumulative excretion of five pulchinenosides from bile after single oral administration 300mg·kg-1 of PRS extract to rats, respectively(a: B3; b: BD; c: B7; d: B10; e: B11) a

| B3 from bile | Excretion | Cumulant | Excretion | Cumulant |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| time(h) | (ng) | (ng) | （%×10-3） | （%×10-3） |
| (0-2) | 3593.39±1207.50 | 3593.39 | 19.88±6.680 | 19.88 |
| (2-4) | 2676.88±694.66 | 6270.27 | 14.80±3.843 | 34.69 |
| (4-6) | 1879.76±832.39 | 8150.03 | 10.39±4.605 | 45.09 |
| (6-8) | 1456.75±1664.76 | 9606.78 | 8.06±3.678 | 53.15 |
| (8-10) | 1067.37±310.56 | 10674.15 | 5.90±1.718 | 59.05 |
| (10-12) | 820.68±182.59 | 11494.83 | 4.54±1.010 | 63.6 |
| (12-14) | 493.65±51.99 | 11988.48 | 2.73±0.2880 | 66.33 |
| (14-16) | 740.62±328.25 | 12729.10 | 4.09±1.816 | 70.42 |
| (16-18) | 58.97±0\* | 12788.07 | 0.3362±0\* | 70.75 |

Remark: \* n=1

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| b |  | | | |
| BD from bile | Excretion | Cumulant | Excretion | Cumulant |
| time(h) | (ng) | (ng) | （%×10-3） | （%×10-3） |
| (0-2) | 1114.60±1132.56 | 1114.6 | 20.08±2.3885 | 20.08 |
| (2-4) | 471.84±45.50 | 1586.44 | 8.502±0.8198 | 28.58 |
| (4-6) | 333.37±53.34 | 1919.81 | 6.006±0.9611 | 34.59 |
| (6-8) | 303.89±73.54 | 2223.7 | 5.476±1.325 | 40.07 |
| (8-10) | 326.73±248.42 | 2550.43 | 5.887±4.476 | 45.95 |
| (10-12) | 181.33±93.96 | 2731.76 | 3.267±1.693 | 49.22 |
| (12-14) | 92.33±33.69 | 2824.09 | 1.664±0.6070 | 50.88 |
| (14-16) | 51.76±4.675 | 2875.85 | 0.93±0.0842 | 51.82 |

(16-18) 0\* 2875.85 0\* 51.82

Remark: \* n=1



Remark:\* n=1

d

Remark:\* n=1

c

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| B7 from bile | Excretion | Cumulant | Excretion | Cumulant |
| time(h) | (ng) | (ng) | （%×10-3） | （%×10-3） |
| (0-2) | 262.53±173.45 | 262.53 | 2.823±1.865 | 2.823 |
| (2-4) | 432.85±310.87 | 695.38 | 4.654±2.267 | 7.477 |
| (4-6) | 489.13±422.03 | 1184.51 | 5.269±2.387 | 12.74 |
| (6-8) | 421.01±114.17 | 1605.53 | 4.527±1.228 | 17.26 |
| (8-10) | 277.13±26.49 | 1882.65 | 2.980±0.2848 | 20.24 |
| (10-12) | 178.75±51.92 | 2061.4 | 1.922±05583 | 22.17 |
| (12-14) | 90.41±42.17 | 2151.8 | 0.9721±0.4534 | 23.14 |
| (14-16) | 130.79±60.25 | 2282.6 | 1.4064±0.6478 | 24.54 |
| (16-18) | 12.63±0\* | 2295.23 | 0.1358±0\* | 24.68 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| B10 from bile | Excretion | Cumulant | Excretion | Cumulant |
| time(h) | (ng) | (ng) | （%×10-3） | （%×10-3） |
| (0-2) | 215.99±109.51 | 215.99 | 2.133±1.082 | 2.133 |
| (2-4) | 333.86±191.77 | 549.85 | 3.297±1.894 | 5.431 |
| (4-6) | 304.98±139.86 | 854.83 | 3.012±1.381 | 8.443 |
| (6-8) | 199.38±56.87 | 1054.21 | 1.969±0.5617 | 10.41 |
| (8-10) | 122.47±50.88 | 1176.68 | 1.210±0.5025 | 11.62 |
| (10-12) | 71.13±35.71 | 1247.81 | 0.7025±0.3527 | 12.32 |
| (12-14) | 45.42±22.13 | 1293.23 | 0.4486±0.2185 | 12.77 |
| (14-16) | 95.21±49.06 | 1388.44 | 0.9404±0.4846 | 13.71 |
| (16-18) | 5.11±0\* | 1393.55 | 0.05047±0\* | 13.76 |

e

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| B11 from bile | Excretion | Cumulant | Excretion | Cumulant |
| time(h) | (ng) | (ng) | （%×10-3） | （%×10-3） |
| (0-2) | 133.89±80.27 | 133.89 | 2.100±1.259 | 2.1 |
| (2-4) | 159.09±30.74 | 292.98 | 2.496±0.4822 | 4.596 |
| (4-6) | 107.86±57.87 | 400.84 | 1.692±0.9078 | 6.288 |
| (6-8) | 99.13±13.41 | 499.97 | 1.555±0.2103 | 7.843 |
| (8-10) | 52.51±55.18 | 552.48 | 0.8237±0.3950 | 8.666 |
| (10-12) | 34.66±12.58 | 587.14 | 0.5437±0.1973 | 9.21 |
| (12-14) | 14.59±6.300 | 601.73 | 0.2289±0.09883 | 9.439 |
| (14-16) | 32.79±12.67 | 634.52 | 0.5143±0.1988 | 9.953 |
| (16-18) | 0.9359±0\* | 635.46 | 0.01468±0\* | 9.968 |

Remark: \* n=1



Fig.6- 2 Mean excretion of five pulchinenosides from bile after single oral administration 300mg.kg-1 of PRS extract to rats in 0-18 h,respectively ( mean ± S.D.)

Fig.6- 3 Cumulative excretion of five pulchinenosides from bile after single oral administration 300mg.kg-1 of PRS extract to rats in 0-18h,respectively (%×10-3)

#### 6.3.2.2

尿排泄

Table 6- 9 Mean and cumulative excretion of five pulchinenosides from urine after single oral administration 300mg. kg-1 of PRS extract to rats in 0-108h, respectively (a: B3; b: BD; c: B7; d: B10; e: B11)

a

| B3 from urine | Excretion | Cumulant | Excretion | Cumulant |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| time(h) | (ng) | (ng) | (%×10-3) | (%×10-3) |
| (0-2) | 455.30±26.24 | 455.31 | 2.518±0.1452 | 2.519 |
| (2-4) | 541.49±41.40 | 996.79 | 2.996±0.2290 | 5.515 |
| (4-6) | 564.97±47.65 | 1561.76 | 3.126±0.2636 | 8.640 |
| (6-8) | 375.73±76.97 | 1937.49 | 2.079±0.4259 | 10.719 |
| (8-12) | 228.94±56.78 | 2166.43 | 1.266±0.3141 | 11.986 |
| (12-24) | 506.55±219.75 | 2672.98 | 2.802±1.215 | 14.788 |
| (24-36) | 249.22±56.46 | 2922.20 | 1.378±0.3123 | 16.167 |
| (36-48) | 300.24±118.30 | 3222.43 | 1.661±0.6545 | 17.828 |
| (48-60) | 165.77±79.05 | 3388.21 | 0.9171±0.4374 | 18.745 |
| (60-84) | 215.51±48.96 | 3603.71 | 1.192±1.930 | 19.938 |
| (84-96) | 129.51±28.97 | 3733.22 | 0.7165±0.1602 | 20.654 |
| (96-108) | 58.03±18.54 | 3791.25 | 0.3210±0.1025 | 20.975 |
| b |  |  |  |  |
| BD from urine | Excretion | Cumulant | Excretion | Cumulant |
| time(h) | (ng) | (ng) | (%×10-3) | (%×10-3) |
| (0-2) | 19.14±5.00 | 19.14 | 0.3450±0.09015 | 0.3450 |
| (2-4) | 38.87±15.81 | 58.01 | 0.7003±0.2848 | 1.045 |
| (4-6) | 15.93±7.169 | 73.94 | 0.29±0.13 | 1.332 |
| (6-8) | 39.31±12.20 | 113.25 | 0.7082±0.2197 | 2.041 |
| (8-12) | 37.40±12.64 | 150.65 | 0.6738±0.2278 | 2.714 |
| (12-24) | 160.47±15.30 | 311.12 | 2.891±0.2757 | 5.606 |
| (24-36) | 72.38±24.00 | 383.49 | 1.304±0.4324 | 6.910 |
| (36-48) | 71.67±12.47 | 455.16 | 1.291±0.2247 | 8.201 |
| (48-60) | 28.34±6.929 | 483.51 | 0.5107±0.1249 | 8.712 |
| (60-84) | 32.41±9.738 | 515.92 | 0.5840±0.1755 | 9.296 |
| (84-96) | 21.7±8.76 | 537.62 | 0.3910±0.01578 | 9.687 |
| (96-108) | 1.625±0.79 | 539.24 | 0.002928±0.01423 | 9.716 |



|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| c |  |  |  |  |
| B7 from urine | Excretion | Cumulant | Excretion | Cumulant |
| time(h) | (ng) | (ng) | (%×10-3) | (%×10-3) |
| (0-2) | 22.06±6.439 | 22.06 | 0.2372±0.06923 | 0.2372 |
| (2-4) | 66.38±6.891 | 88.44 | 0.7137±0.07410 | 0.9510 |
| (4-6) | 95.25±25.98 | 183.69 | 1.024±0.2793 | 1.975 |
| (6-8) | 59.05±7.834 | 242.74 | 0.6349±0.08423 | 2.610 |
| (8-12) | 46.55±10.62 | 289.29 | 0.5005±0.1142 | 3.111 |
| (12-24) | 94.90±24.31 | 384.19 | 1.020±0.2614 | 4.131 |
| (24-36) | 139.22±65.68 | 523.41 | 1.497±0.7062 | 5.628 |
| (36-48) | 154.29±26.95 | 677.70 | 1.659±0.2898 | 7.287 |
| (48-60) | 57.72±34.47 | 735.42 | 0.6206±0.3706 | 7.908 |
| (60-84) | 37.93±17.86 | 773.36 | 0.4079±0.1921 | 8.316 |
| (84-96) | 58.32±25.75 | 831.68 | 0.6271±0.2769 | 8.943 |
| (96-108) | 43.70±21.48 | 875.38 | 0.4699±0.2310 | 9.413 |
| d |  |  |  |  |
| B10 from urine | Excretion | Cumulant | Excretion | Cumulant |
| time(h) | (ng) | (ng) | (%×10-3) | (%×10-3) |
| (0-2) | 11.37±5.685 | 1.13 | 0.5665±0.2833 | 0.0112 |
| (2-4) | 19.07±8.713 | 20.20 | 0.1883±0.08605 | 0.1995 |
| (4-6) | 26.85±10.76 | 47.05 | 0.2652±0.1063 | 0.4647 |
| (6-8) | 15.50±7.27 | 27.00 | 0.1530±0.07177 | 0.6177 |
| (8-12) | 24.17±10.56 | 86.72 | 0.2039±0.1043 | 0.8565 |
| (12-24) | 55.02±25.35 | 141.74 | 0.5435±0.2503 | 1.400 |
| (24-36) | 68.99±30.41 | 210.73 | 0.6814±0.3003 | 2.081 |
| (36-48) | 94.18±45.73 | 304.91 | 0.9301±0.4517 | 3.011 |
| (48-60) | 88.15±40.19 | 393.06 | 0.8706±0.3970 | 3.882 |
| (60-84) | 33.94±7.53 | 427.00 | 0.3352±0.07440 | 4.217 |
| (84-96) | 37.54±19.50 | 464.54 | 0.3707±0.1926 | 4.588 |
| (96-108) | 31.00±11.19 | 495.55 | 0.3062±0.1105 | 4.894 |
| e |  |  |  |  |
| B11 from urine | Excretion | Cumulant | Excretion | Cumulant |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| time(h) | (ng) | (ng) | (%×10-3) | (%×10-3) |
| (0-2) | 7.245±3.733 | 7.24 | 0.1136±0.05856 | 0.1136 |
| (2-4) | 18.42±9.602 | 25.66 | 0.2889±0.1506 | 0.4025 |
| (4-6) | 10.49±3.062 | 36.15 | 0.1646±0.04849 | 0.5671 |
| (6-8) | 13.58±6.670 | 49.73 | 0.2130±0.1046 | 0.7801 |
| (8-12) | 10.48±5.299 | 70.22 | 0.1645±0.08312 | 1.101 |
| (12-24) | 26.74±9.333 | 96.96 | 0.4195±0.1464 | 1.521 |
| (24-36) | 36.39±8.469 | 133.35 | 0.5708±0.1328 | 2.092 |
| (36-48) | 28.88±8.768 | 162.23 | 0.4530±0.1375 | 2.545 |
| (48-60) | 36.63±9.884 | 198.86 | 0.5746±0.1550 | 3.119 |
| (60-84) | 21.02±3.485 | 219.87 | 0.3297±0.05467 | 3.449 |
| (84-96) | 28.42±11.63 | 248.30 | 0.4458±0.1824 | 3.895 |
| (96-108) | 7.652±3.798 | 255.95 | 0.1200±0.05958 | 4.015 |



Fig. 6- 4 Mean excretion of five pulchinenosides from urine after single oral administration 300mg. kg-1 of PRS extract to rats in 0-108h, respectively ( mean 土S. D.)



Fig. 6- 5 Cumulative excretion of five pulchinenosides from urine after single oral administration 300mg. kg-1 of PRS extract to rats in 0-108h, respectively (%×10-3)

#### 6.3.2.3 粪排泄



Table6- 10 Mean and cumulative excretion of five pulchinenosides from feces after single oral administration 300mg.kg-1 of PRS extract to rats in 0-108h,respectively (a:B3;b:BD;c:B7;d:B10;e:B11)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| a |  | | | |
| B3 from feces | Excretion | Cumulant | Excretion | Cumulant |
| time(h) | (×103ng) | (×103ng) | (%) | (%) |
| (0-2) | 5.922±0.8711 | 5.923 | 0.0328±0.0048 | 0.03 |
| (2-4) | 139.99±1.811 | 145.91 | 0.7745±0.0100 | 0.80 |
| (4-6) | 71.66±6.271 | 217.58 | 0.3965±0.0347 | 1.20 |
| (6-8) | 0.00 | 217.58 | 0.00 | 1.20 |
| (8-12) | 0.00 | 217.58 | 0.00 | 1.20 |
| (12-24) | 3060.28±1316.99 | 3277.86 | 16.93±7.286 | 18.13 |
| (24-36) | 1065.69±849.48 | 4343.55 | 5.896±0.2738 | 24.03 |
| (36-48) | 726.62±30.60 | 5070.17 | 4.020±0.1693 | 28.05 |
| (48-60) | 61.26±8.331 | 5131.43 | 0.3389±0.04609 | 28.39 |
| (60-84) | 576.81±47.20 | 5708.25 | 3.191±0.2612 | 31.58 |
| (84-96) | 74.50±2.424 | 5782.75 | 0.4122±0.01341 | 31.99 |
| (96-108) | 8.220±0.7843 | 5790.97 | 0.04557±0.004339 | 32.04 |
| b |  |  |  |  |
| BD from feces | Excretion | Cumulant | Excretion | Cumulant |
| time(h) | (×103ng) | (×103ng) | (%) | (%) |



d

B10 from feces

Excretion

Cumulant

Excretion

Cumulant

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| (0-2) | 0.2868±0.3451 | 0.2868 | 0.0052±0.0006218 | 0.005 |
| (2-4) | 53.52±8.015 | 53.81 | 0.96±0.1444 | 0.970 |
| (4-6) | 10.67±1.502 | 64.49 | 0.19±0.02707 | 1.162 |
| (6-8) | 0.00 | 64.49 | 0.000 | 1.162 |
| (8-12) | 0.00 | 64.49 | 0.000 | 1.162 |
| (12-24) | 738.32±65.61 | 802.80 | 13.30±1.182 | 14.46 |
| (24-36) | 187.23±46.16 | 990.03 | 3.373±0.8318 | 17.84 |
| (36-48) | 129.41±39.38 | 1119.44 | 2.332±0.7096 | 20.17 |
| (48-60) | 6.479±0.7128 | 1125.92 | 0.1167±0.01284 | 20.29 |
| (60-84) | 53.71±0.9726 | 1179.64 | 0.9678±0.01752 | 21.26 |
| (84-96) | 43.80±0.8800 | 1223.43 | 0.7891±0.01585 | 22.04 |
| (96-108) | 3.203±0.7106 | 1226.64 | 0.05771±0.0128 | 22.10 |
| c |  |  |  |  |
| B7 from feces | Excretion | Cumulant | Excretion | Cumulant |
| time(h) | (×103ng) | (×103ng) | (%) | (%) |
| (0-2) | 3.629±0.3685 | 3.628 | 0.03902±0.0040 | 0.039 |
| (2-4) | 86.25±1.149 | 89.90 | 0.9276±0.01235 | 0.967 |
| (4-6) | 36.26±2.784 | 126.15 | 0.3899±0.02994 | 1.357 |
| (6-8) | 0.00 | 126.15 | 0.000 | 1.357 |
| (8-12) | 0.00 | 126.15 | 0.000 | 1.357 |
| (12-24) | 1597.53±622.75 | 1723.68 | 17.18±6.696 | 18.53 |
| (24-36) | 667.28±10.79 | 2390.96 | 7.175±0.1161 | 25.71 |
| (36-48) | 481.04±54.29 | 2872.00 | 5.172±0.5838 | 30.88 |
| (48-60) | 36.13±5.386 | 2908.12 | 0.3884±0.05792 | 31.27 |
| (60-84) | 238.50±36.88 | 3146.63 | 2.5645±0.3966 | 33.84 |
| (84-96) | 41.14±9.810 | 3187.77 | 0.4424±0.1055 | 34.28 |
| (96-108) | 6.435±0.6549 | 3194.20 | 0.069±0.007041 | 34.35 |



|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| time(h) | (×103ng) | (×103ng) | (%) | (%) |
| (0-2) | 2.166±0.7214 | 2.166 | 0.02139±0.007125 | 0.0214 |
| (2-4) | 56.22±5.055 | 58.39 | 0.5553±0.04993 | 0.5767 |
| (4-6) | 12.53±3.851 | 70.92 | 0.1238±0.03803 | 0.7005 |
| (6-8) | 0 | 70.92 | 0 | 0.7005 |
| (8-12) | 0 | 70.92 | 0 | 0.7005 |
| (12-24) | 416.22±11.84 | 487.15 | 4.111±0.1169 | 4.811 |
| (24-36) | 337.14±23.29 | 824.28 | 3.330±0.2300 | 8.141 |
| (36-48) | 242.03±8.074 | 1066.31 | 2.390±0.07974 | 10.53 |
| (48-60) | 19.00±3.569 | 1085.31 | 0.1876±0.03525 | 10.72 |
| (60-84) | 95.35±22.80 | 1180.66 | 0.9417±0.2252 | 11.66 |
| (84-96) | 21.09±7.327 | 1201.75 | 0.2083±0.07236 | 11.87 |
| (96-108) | 3.057±0.5383 | 1204.81 | 0.03019±0.0005316 | 11.90 |
| e |  |  |  |  |
| B11 from feces | Excretion | Cumulant | Excretion | Cumulant |
| time(h) | (×103ng) | (×103ng) | (%) | (%) |
| (0-2) | 1.781±0.1466 | 1.781 | 0.02794±0.002300 | 0.0279 |
| (2-4) | 30.459±2.275 | 32.24 | 0.4778±0.03568 | 0.5057 |
| (4-6) | 13.36±3.195 | 45.60 | 0.2096±0.05012 | 0.7154 |
| (6-8) | 0.00 | 45.60 | 0.000 | 0.7154 |
| (8-12) | 0.00 | 45.60 | 0.000 | 0.7154 |
| (12-24) | 424.79±27.72 | 470.40 | 6.663±0.4348 | 7.379 |
| (24-36) | 251.75±66.46 | 722.15 | 3.949±1.0425 | 11.33 |
| (36-48) | 198.50±94.39 | 920.65 | 3.114±1.480 | 14.44 |
| (48-60) | 18.46±1.982 | 939.11 | 0.2896±0.03109 | 14.73 |
| (60-84) | 60.35±3.177 | 999.46 | 0.9467±0.0498 | 15.69 |
| (84-96) | 40.68±4.678 | 1040.14 | 0.6381±0.07338 | 16.32 |
| (96-108) | 1.442±0.2267 | 1041.59 | 0.02263±0.003556 | 16.34 |





Fig.6- 6 Mean excretion of five pulchinenosides from feces after single oral administration 300mg.kg-1 of PRS extract to rats in 0-108h,respectively ( mean ± SD.)

Fig.6- 7 Cumulative excretion of five pulchinenosides from feces after single oral administration 300mg.kg-1 of PRS extract to rats in 0-108h,respectively (%)

## 6.4 讨论

### 6.4.1 白头翁皂苷在大鼠体内的排泄情况

#### 6.4.1.1 胆汁

由Table6- 8、Fig.6- 2和Fig.6- 3可以看出，灌胃给予大鼠白头翁皂苷后0-18 h内，原型药物(B3、BD、B7、B10、B11) 在大鼠胆汁中累积排泄量总计19.99 μg，不

足给药量的0.04%，说明其在大鼠中存在肝肠循环现象，但较微弱。胆汁中白头翁皂苷的排泄高峰出现在0 ~ 2 h，此后经该途径的排泄变得极为微弱，给药18 h后几乎无法再从胆汁样品中检测到原型药物的存在

#### 6.4.1.2 尿

由Table6- 8、Fig.6- 4和Fig.6- 5可以看出，灌胃给予大鼠白头翁皂苷后0-108 h内，原型药物(B3、BD、B7、B10、B11)在尿中的累积排泄量总计为5.201g，不足给药量的0.01 %，说明尿液排泄不是原型药物主要排泄途径，这也与组织分布研究中白头翁皂苷在肾脏和膀胱中的检出量较少的实验结果一致。

#### 6.4.1.3 粪

由Table6- 10、Fig.6- 6和Fig.6- 7可以看出，0-108 h内白头翁皂苷随粪排出的原型药物量(B3、BD、B7、B10、B11)总计为12458.21g，达到给药量的25.21%。粪排泄高峰出现在给药后的12-48 h时间段，排泄平稳而缓慢。与文献报道一致[4, 5, 6]。



### 6.4.2 白头翁皂苷排泄特征

由于基本母核结构相似，5种皂苷白头翁的排泄规律相类似，未显示出显著性差异。将该类皂苷的排泄特征总结如下：

在大鼠尿液、粪便、胆汁中均可检测到药物原型，说明其可以通过以上三种途径排泄，其中粪排泄是白头翁皂苷主要的排泄途径。经各个排泄途径可检测到的原型药物量(B3、BD、B7、B10、B11)的总计为12483.40g，约为给药剂量的25.25%。可见给予大鼠白头翁皂苷后大部分未被吸收，直接以原型形式排出体外。

白头翁皂苷的上述排泄特征与其极低的生物利用度结果(Fa＜2.5%)相一致，大部分齐墩果烷型五环三萜皂苷未以原型形式被机体吸收利用，肠道是该类成分发生生物转化的主要场所，因此，进一步研究这类皂苷的代谢过程，尤其是寻找在肠道菌群作用下白头翁皂苷产生的代谢变化，推断其主要代谢产物对本课题系统阐明白头翁皂苷的药代动力学过程的研究目标具有十分重要的意义。

参考文献

[1] 梁文权, 李高, 刘建平. 生物药剂学与药物动力学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.

[2] Paradkar A. Biopharmaceutics & Pharmacokinetics [M]. Pune: Pragati Books Pvt. Ltd, 2008.

[3] Liu Y L, Song Y G, Xu Q M, et al. Validated rapid resolution LC-ESI–MS/MS method for simultaneous determination of five pulchinenosides fromPulsatilla chinensis (Bunge) Regel in rat plasma: Application to pharmacokinetics and bioavailability studies [J]. *J Chromatogra B*, 2013, 942-943: 141-150.

[4] 韦凤华, 宋林, 何毅, 等, 人参皂苷Rg1 在大鼠体内的代谢与排泄研究[J]. 华西药学杂志, 2010, 25(3): 302-305.

[5] 杨秀伟, 桂方晋, 田建明, 等. 人参皂苷-Rg2 在大鼠体内的药代动力学[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(7): 967-970.

[6] 邴飞虹, 易艳东, 张国斌. 蜈蚣三七有效成分W3单次给药后在小鼠体内的药代动力学[J]. 中国药科大学学报, 2006, 37(6): 523-526.

## 第七章 白头翁皂苷的肠道菌群降解动力学研究

本课题组前期药理实验表明白头翁总皂苷具有明显的抗肿瘤活性，体内实验的药代动力学特征显示其吸收较差，大部分齐墩果烷型五环三萜皂苷未以原型形式被机体吸收利用。另有报道，中草药口服后，药物中的有效成分在进入肠道之后不可避免地与肠道菌群发生关联，某些成分经相应细菌的作用发生代谢转化后被吸收，较小部分的成分则以原形物直接被吸收。它们以原形物显示药理活性的可能性较小，可能为经肠菌代谢后被水解，从而生成苷元而发挥其药理作用，这类药被认为是“天然前体药物”[1]。体内环境中肠道菌群是完成中药有效成分代谢的重要因素之一[2]。糖类化合物是肠道菌群重要的碳源，因此，肠道细菌的苷键水解酶系对具有苷键的药物进行水解是肠道菌群代谢药物的一大特征。

本实验通过体外大鼠肠道菌群实验研究中药白头翁皂苷的降解变化规律，揭示其抗肿瘤的药代动力学特征，为合理利用白头翁资源提供科学依据。



## 7.1 仪器与材料

### 7.1.1 仪器

见《白头翁皂苷的大鼠肠吸收研究》中的“仪器”部分。

### 7.1.2 药品与试剂

白头翁皂苷制备和含量测定见《白头翁总皂苷的化学成分及其含量测定研究》部分，5种皂苷的标准品(B3、BD、B7、B10、B11)（纯度> 98%）制备同样见《白头翁总皂苷的化学成分及其含量测定研究》部分。

水为去离子水，甲醇为色谱纯（上海振兴化工一厂），其余试剂均为分析纯。

### 7.1.3 实验动物

雄性SD大鼠，体重(200±25) g, 江西中医药大学清洁级动物中心提供，合格证号合格证号：SCXXK (赣) 2005-0001。实验前3天饲养于昼夜自然循环的控制环境中[22±2℃, RH (50±20) %]。动物实验遵循中华人民共和国国家科学技术委员会实验动物管理条例。

### 7.1.4 厌氧菌培养液和肠道孵育液的组成和制备

#### 7.1.4.1 厌氧菌培养液的组成和制备

取37.5 mL溶液A (0.78% K2HPO4), 37.5 mL 溶液B (0.47% KH2PO4; 1.18%

NaCl; 1.2% (NH2) 2SO4; 0.12% CaCl2; 0.25% MgSO4·H2O), L-eysteine· H2O 0.5 g, 25%

L-ascorbic acid 2 mL，8% Na2CO3 50 mL，牛肉膏1 g，蛋白胨1 g，加蒸馏水至1 L，最后调pH 7.5-8.0，得厌氧菌培养液。

#### 7.1.4.2 肠道孵育液的制备

大鼠的新鲜粪便分别与生理盐水按比例1 g: 4 mL 混合制成悬浊液，4500

r・min-1，离心10 min 后得上清液，即为肠道菌液。取80 mL 肠道菌液，加至720 mL

厌氧培养液中，混匀后得肠道孵育液。

### 7.1.5

白头翁总皂苷肠道孵育

取上述大鼠肠菌孵育液10 mL，加白头翁总皂苷5.08 mg，混匀溶解，再将混匀的溶液分装(1mL/管)，于37℃厌氧条件下培养0、1、2、4、6、8、10、16、24、

36、48 h。

## 7.2 分析方法的建立与验证

### 7.2.1 标准溶液和样品的制备

#### 7.2.1.1 储备液和对照品溶液的制备

以甲醇为溶剂，精密配制含白头翁皂苷B3、BD、B7、B10和B11分别为1000.00、920.00、1000.00、820.00和1040.00µg・mL-1 的混合标准贮备液，置4℃保存。

分别精密量取白头翁皂苷储备液适量置10 mL容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配置成白头翁系列标准溶液。如Table7-1。

Table 7- 1 Series of working solutions of these analyses

| Working  solutions | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| /(µg·mL-1) |  |  |  |  |  |  |
| B3 | 40.00 | 100.00 | 200.00 | 500.00 | 750.00 | 1000.00 |
| BD | 36.80 | 92.00 | 184.00 | 460.00 | 690.00 | 920.00 |
| B7 | 40.00 | 100.00 | 200.00 | 500.00 | 750.00 | 1000.00 |

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| B10 | 32.80 | 82.00 | 164.00 | 410.00 | 615.00 | 820.00 |
| B11 | 41.60 | 104.00 | 208.00 | 520.00 | 780.00 | 1040.00 |

#### 7.2.1.2 样品处理

取上述厌氧培养一定时间后白头翁肠道孵育液（1 mL/管），加甲醇1 mL终止反应，漩涡振荡2 min，N2吹干，加超纯水1 mL复溶，SPE分离，5 mL超纯水淋洗，5 mL甲醇洗脱，收集甲醇洗脱液，N2吹干，0.2 mL甲醇复溶，漩涡振荡2 min，0.45µM微孔滤膜滤过。同时做空白实验。

### 7.2.2 分析方法的建立

#### 7.2.2.1 色谱条件

流动相A为甲醇，B为水，梯度洗脱，程序为0 ~ 30 min，A (75% ~ 90%)；



流速1. 0 mL·min-1；柱温25℃；蒸发光散射检测器漂移管温度为75℃，气体流速

为2.0 L·min-1；进样体积20µL 。

#### 7.2.2.2 标准曲线的建立

取空白肠道孵育液（1 mL/管），加系列标准溶液0.2 mL 和甲醇0.8 mL ，其余同“样品处理”项中“漩涡振荡2 min”至“0.45µM微孔滤膜滤过”。取上清液20

µL进HPLC-ELSD仪分析。

记录白头翁皂苷B3、BD、B7、B10、B11峰面积，分别以孵育液中各待测成分的浓度为横坐标，各待测成分的峰面积为纵坐标，作线性回归，得白头翁皂苷的标准曲线方程。

#### 7.2.2.3 精密度实验

取空白肠道孵育液(1 mL/管)，加高、中、低浓度对照品(分别含B3 (40, 200, 1000µg. mL-1), BD (36.8, 184, 920µg. mL-1), B7 (40, 200, 1000µg. mL-1), B10(32.8,

164,820µg・mL-1），B11(41.6, 208, 1040µg·mL-1))溶液0.2 mL，再加甲醇0.8 mL，其余同“样品处理”项中“漩涡振荡2 min”至“0.45µM微孔滤膜滤过”。取上清液20µL进HPLC-ELSD仪分析。每个浓度制备6份，每个浓度连续进样6次，测定日内精密度。重复操作，连续测定3 天并随行标准曲线，计算日间精密度。

#### 7.2.2.4 提取回收率实验

取上述空白肠道孵育液(1 mL/管)，加高、中、低浓度对照品溶液0.2 mL，再

加甲醇0.8 mL，其余同“样品处理”项中“漩涡振荡2 min”至“0.45µM微孔滤膜滤过”。取上清液20µL进HPLC-ELSD仪分析。记录各待测化合物经提取后得到峰面积(A1)。另取上述厌氧培养一定时间后白头翁肠道孵育液(1 mL/管)，加甲醇1 mL终止反应，漩涡振荡2 min ，N2 吹干，加超纯水1 mL复溶，SPE柱分离，

5 mL超纯水淋洗，5 mL甲醇洗脱，收集甲醇洗脱液，N2吹干，分别用0.2 mL高、中、低浓度对照品溶液复溶，漩涡振荡2 min, 0.45µM微孔滤膜滤过。记录未经提取直接进样获得的色谱峰面积(A2)。计算提取回收率(A1/A2×100%)。

#### 7.2.2.5 样品稳定性实验

样品稳定性评价为待测物样品室温放置24 h 的稳定性。

### 7.2.3 方法学验证结果分析

#### 7.2.3.1

方法专属性



在确定的HPLC-ELSD条件下，5个白头翁皂苷的检测具有较高选择性，色谱峰良好，内源性物质无干扰。典型色谱图见Fig.7- 1。

mAU

**a**

400

350

300

250

200

150

100

50

ADC1 A, ADC1 CHANNEL A (LYL\20130812\用于论文的HPLC-ELSD文件\BLANK.D)

5 10 15 20 25

min

**b** mAU

400

350

300

250

200

150

100

50

ADC1 A, ADC1 CHANNEL A (LYL\20130812\用于论文的HPLC-ELSD文件\BLANK+BTW.D)

B3 BD

B7

B10 B11

5 10 15 20 25

min

mAU

**c**

700

600

500

400

300

200

100

0

ADC1 A, ADC1 CHANNEL A (LYL\20130812\用于论文的HPLC-ELSD文件\SAMPLE.D)

B3

BD B7 B10 B11

5 10 15 20 25

min

Fig.7- 1 Representative HPLC-ELSD chromatogram(a: blank incubation; b: The blank incubation spiked with pulchinenosides; c: The sample of 2 h)

#### 7.2.3.2 标准曲线和线性范围

待测物的线性范围、回归方程和相关系数见Table7- 2。标准曲线范围满足孵育样品的浓度要求，5 个分析样品在8.000-200.00µg・mL-1 (B3), 7.360-184.00µg・mL-1 (BD)，

8.000-200.00µg·mL-1 (B7), 6.560-164.00µg·mL-1 (B10), 8.320-208.00µg·mL-1 (B11) 的

范围内线性较好，*r2*> 0.99。

Table7- 2 Regression data of the multi-components determined (n=6).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Components | Linear range (µg·mL-1) | Linear regression equation | Correlation coefficient (*r2*) |
| B3 | 8.000-200.00 | y=0.79x+0.48 | 0.9969 |
| BD | 7.360-184.00 | y=0.69x+1.01 | 0.9956 |
| B7 | 8.000-200.00 | y=0.73x+1.12 | 0.9957 |
| B10 | 6.560-164.00 | y=0.43x+0.78 | 0.9983 |
| B11 | 8.320-208.00 | y=0.2x+0.83 | 0.9989 |

#### 7.2.3.3 精密度



2.6% ~ 11.7%。

Table7- 3 Precisions of B3, BD, B7, B10 and B11for HPLC–ELSD method

Intra-day(n=3)

Components Spiked(µg·mL-1)

Measured

concentration(µg·mL-1)

Precision(%,

RSD)

Inter-day(n=6)

Measured

Precision(%,

concentration

(µg·mL-1)

RSD)

方法精密度和准确度见Table7- 3。日内和日间精密度分别为2.7% ~ 13.0% 和

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| B3 |  | | | | |
|  | 8.000 | 6.876 | 7.7 | 7.844 | 11.0 |
|  | 40.00 | 38.69 | 8.7 | 37.66 | 11.7 |
| BD | 200.00 | 221.37 | 6.3 | 196.71 | 11.4 |
| 7.360 | | 6.698 | 4.3 | 7.198 | 9.6 |
| 36.80 | | 32.07 | 6.1 | 35.25 | 9.2 |
| 184.00 | | 175.28 | 8.3 | 159.95 | 5.3 |
| B7 |  |  |  |  |  |
| 8.000 | | 9.174 | 2.7 | 7.026 | 4.7 |
| 40.00 | | 42.33 | 10.0 | 37.31 | 3.7 |
| 200.00 | | 198.62 | 8.3 | 198.84 | 3.2 |
| B10 |  |  |  |  |  |
| 6.560 | | 6.736 | 4.6 | 6.210 | 11.6 |
| 32.80 | | 29.59 | 6.4 | 37.26 | 10.0 |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 164.00 | 164.21 | 11.3 | 163.95 | 2.7 |
| B11 |  |  |  |  |  |
|  | 8.320 | 7.676 | 3.7 | 7.644 | 3.4 |
|  | 41.60 | 39.53 | 13.0 | 40.37 | 8.7 |
|  | 208.00 | 196.86 | 12.5 | 186.31 | 11.4 |

#### 7.2.3.4 提取回收率

如Table7- 4，白头翁皂苷B3、BD、B7、B10 和B11 的平均提取回收率为87.11%

~ 99.71%, RSD≤14.0% 。

Table 7- 4 The Extraction recoveries of B3, BD, B7, B10 and B11for HPLC–ELSD method (*n*=6)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Components | spiked(µg·mL-1) |  | |
|  |  | Recovery(%) | RSD(%) |
| B3 |  |  |  |
|  | 8.000 | 87.11 | 3.1 |
|  | 40.00 | 98.47 | 2.4 |
|  | 200.00 | 99.40 | 6.2 |
| BD |  |  |  |
|  | 7.360 | 92.04 | 2.1 |
|  | 36.80 | 99.71 | 9.3 |
|  | 184.00 | 98.17 | 12.1 |
| B7 |  |  |  |
|  | 8.000 | 97.67 | 6.2 |
|  | 40.00 | 98.75 | 8.3 |
|  | 200.00 | 98.84 | 5.6 |
| B10 |  |  |  |
|  | 6.560 | 96.44 | 9.1 |
|  | 32.80 | 99.10 | 6.5 |
|  | 164.00 | 97.33 | 14.0 |
| B11 |  |  |  |
|  | 8.320 | 93.41 | 2.0 |
|  | 41.60 | 97.78 | 9.3 |
|  | 208.00 | 99.71 | 4.7 |

Extraction recovery



#### 7.2.3.5 稳定性

实验结果的稳定性见Table7- 5. 室温静置24 h (RE: −5.6%～13.6%, RSD≤9.2%)

的条件下稳定。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Spiked Measured RSD | | | | RE |
| Components | (µg.mL-1) | -1 | (%) | (%) |
| B 3 |  |  |  |  |
|  | 8.000 | 8.536 | 9.2 | 6.7 |
|  | 40.00 | 39.07 | 6.5 | -2.3 |
|  | 200.00 | 202.71 | 4.3 | 1.4 |
| BD |  |  |  |  |
|  | 7.360 | 6.948 | 5.2 | -5.6 |
|  | 36.80 | 35.73 | 7.6 | -2.9 |
|  | 184.00 | 183.56 | 8.5 | -0.2 |
| B7 |  |  |  |  |
|  | 8.000 | 7.728 | 2.1 | -3.5 |
|  | 40.00 | 43.67 | 7.5 | 9.2 |
|  | 200.00 | 227.25 | 3.6 | 13.6 |
| B10 |  |  |  |  |
|  | 6.560 | 6.234 | 4.0 | -5.0 |
|  | 32.80 | 31.15 | 5.8 | -5.0 |
|  | 164.00 | 163.93 | 6.2 | 0.0 |
| B11 |  |  |  |  |
|  | 8.320 | 8.056 | 3.6 | -3.2 |
|  | 41.60 | 40.75 | 6.7 | -2.0 |
|  | 208.00 | 213.47 | 2.0 | 2.6 |

Table 7- 5 Stability for analysis of B3, BD, B7, B10 and B11 in incubation

Concentration(µg.mL )



## 7.3 白头翁皂苷在大鼠肠道菌群降解

### 7.3.1 肠道孵育液的制备与测定

按照本章中“肠道孵育液的制备”和“样品处理”项下制备分析样品，按照色谱条件进样，测定。

### 7.3.2 白头翁皂苷在大鼠肠道菌群降解结果

#### 7.3.2.1 肠道菌群代谢后孵育液中浓度和剩余率

以白头翁总皂苷各有效成分的浓度响应值和相对剩余百分含量(lnCt/C0)为考察指标，在现有检测条件下，检测结果显示在48 h的观测期内各有效成分在大鼠肠道菌群中的降解显著，如Table7- 6，以白头翁皂苷在大鼠肠道菌群孵育液中的相对剩余百分含量对时间作图，见Fig.7- 2。

Table 7- 6 The time-residual contents for B3, BD, B7, B10 and B11

components



Fig.7- 2 Logarithms of residual content (lnCt/C0) vs time for five pulchinenosides

time B3 BD B7 B10 B11

| h | concentration | ln | concentration | ln | concentration | ln | concentration | ln | concentration | ln |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | （µg·mL-1） | (Ct/C0) | （µg·mL-1） | (Ct/C0) | （µg·mL-1） | (Ct/C0) | （µg·mL-1） | (Ct/C0) | （µg·mL-1） | (Ct/C0) |
| 0 | 550.14 | 0.00 | 202.40 | 0.00 | 278.96 | 0.00 | 241.90 | 0.00 | 189.78 | 0.00 |
| 1 | 467.87 | -0.16 | 166.07 | -0.20 | 360.93 | 0.26 | 227.37 | -0.06 | 169.23 | -0.11 |
| 2 | 408.06 | -0.30 | 142.27 | -0.35 | 331.99 | 0.17 | 188.10 | -0.25 | 140.18 | -0.30 |
| 4 | 320.14 | -0.54 | 137.89 | -0.38 | 283.43 | 0.02 | 189.00 | -0.25 | 123.10 | -0.43 |
| 6 | 250.49 | -0.79 | 126.99 | -0.47 | 247.67 | -0.12 | 168.84 | -0.36 | 112.90 | -0.52 |
| 8 | 219.52 | -0.92 | 117.47 | -0.54 | 202.98 | -0.32 | 155.49 | -0.44 | 107.57 | -0.57 |
| 10 | 181.53 | -1.11 | 88.14 | -0.83 | 155.41 | -0.59 | 130.68 | -0.62 | 95.99 | -0.68 |
| 20 | 93.27 | -1.78 | 62.36 | -1.18 | 65.02 | -1.46 | 101.06 | -0.87 | 78.87 | -0.88 |
| 24 | 82.49 | -1.90 | 50.38 | -1.39 | 62.01 | -1.50 | 88.08 | -1.01 | 67.96 | -1.03 |
| 32 | 49.58 | -2.41 | 37.90 | -1.68 | 41.77 | -1.90 | 62.66 | -1.35 | 44.07 | -1.46 |
| 48 | 14.29 | -3.65 | 21.25 | -2.25 | 28.45 | -2.28 | 33.85 | -1.97 | 20.99 | -2.20 |

#### 7.3.2.2 降解参数计算

根据白头翁皂苷在大鼠肠道孵育液中经不同时间孵育后的拟合曲线方程可知其符合一级降解动力学特征，经公式lnCA=lnC0-KAt (CA为不同时间点浓度，C0 为零时浓度，KA为降解数率常数)，计算其降解速率常数KA，有效期t0.9和半衰期t0.5，如Table7- 7。可知白头翁皂苷B3，BD，B7, B10和B11在大鼠肠道孵育液中迅速降解，有效期为1.5～2.5 h，半衰期为8～16 h。肠道菌群是白头翁皂苷原型化合物发生代谢的重要因素。

Table 7- 7 The main degradation parameters of five pulchinenosides

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Components K /h-1 t /h | | | Correlation  t /h | |
|  | | | 0.5  coefficient(r2) | |
| B3 | 0.0794 | 1.327 | 8.730 | 0.9649 |
| BD | 0.0523 | 2.015 | 13.25 | 0.9289 |
| B7 | 0.0539 | 1.955 | 12.86 | 0.9284 |
| B10 | 0.0426 | 2.473 | 16.27 | 0.9729 |
| B11 | 0.0468 | 2.251 | 14.81 | 0.9348 |

A 0.9

## 7.4 讨论



### 7.4.1 白头翁皂苷的肠道菌群降解情况

大量研究发现，皂苷类化合物在肠道内都较难吸收，生物利用度低，肠内滞留时间长，而易受到肠道菌群的作用。因此，肠道菌群是完成大多数皂苷类化合物有效成分代谢的重要因素之一。本实验中，采用离体方法分析白头翁总皂苷在大鼠肠道菌群中的代谢情况，结果表明白头翁皂苷在肠道菌群的作用下，被显著代谢，消除行为符合一级降解动力学特征。有效期为1.5～2 h，半衰期为10～15 h，能够被肠道菌群迅速降解。因此，对降解产物和降解规律的进一步研究，将有助于寻找白头翁产生抗肿瘤药理活性的“天然前体药物”或“活性代谢产物”。

### 7.4.2 样品处理方法的选择

由于厌氧菌培养液中的内源性物质能与药物及代谢物相结合，同时，微量药物分布在大量的生物介质中，干扰HPLC分析。预实验中采用以下三种方法前处理样品：

采用正丁醇为萃取液的液液萃取法(LLE)；采用C18填料的固相微萃取(SPE)。结果显示，采用SPE法进行样品前处理，提取效率最高，白头翁5种皂苷的提取回收率可达80%，样品中内源性物质去除较完全，可以获得满意的分离效果。

参考文献

[1] Li C, Homma M, Oka K. Characteristica of delayed excretion of flavonoids in human urine after administration of sho-saiko-to, a herbal medicine [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 1999, 21(12): 1251-1257.

[2] Zuo F, Yan M Z, Zhou Z M, et al. Reasearch Progress on Metabbolism of effective ingredients of Chinese material medica in intestina flora [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2002, 27(8): 568-572.



## 第八章 白头翁皂苷在大鼠肠道菌群中的代谢产物初探

头翁皂苷进入血液的浓度较低，生物利用度较低，提示应对其代谢产物进行研究。由于皂苷类物质在体内代谢转化器和酶系的多样性作用下，其代谢产物在体内的浓度较低，肠内滞留时间长，易受到肠道菌群的作用[1]，大量文献研究表明皂苷类成分主要在肠道菌群中被代谢[2,3,4,5]，所以皂苷类物质多采用体外肠道孵育为典型代谢研究方式，本文采用离体培养大鼠肠内菌，分别与各有效成分厌氧温孵，并运用UHPLC-Q-TOF仪器与Metabolite ID数据处理软件分析，分析白头翁抗肿瘤有效成分B3、BD、B7、B10、B11的代谢特征，并对代谢产物进行结构推断，为其进一步化学结构改造寻找其他活性药物提供参考。

## 8.1 仪器与材料



### 8.1.1 仪器

Agilent 1290超高压液相色谱(UHPLC) (Agilent Technologies, Palo alto, USA), 电喷雾离子源(ESI), 四级杆-飞行时间串联质谱仪(Q-TOF) (Agilent QTOF 6540)。UHPLC配置四元液相泵(G4410A)、二极管阵列检测器(DAD)、自动进样器(G2200A)和自动恒温柱温箱(G2300B)。

CO2培养箱(SANYO MCO-17AIC); SPE固相微萃取小柱(Agela Cleanert ODS C18, 200mg/3mL); DT5-3型低速台式自动平衡离心机（北京时代北利离心有限公司）; IKA涡旋仪; KQ3200E型超声波仪；岛津十万分之一天平（AUW2200型电子分析天平） 。

### 8.1.2 药品与试剂

白头翁皂苷制备和含量测定见《白头翁总皂苷的化学成分及其含量测定研究》部分，5种皂苷的标准品(B3、BD、B7、B10、B11)（纯度> 98%）制备同样见《白头翁总皂苷的化学成分及其含量测定研究》部分。

水为去离子水，甲醇为色谱纯（上海振兴化工一厂），其余试剂均为分析纯。

### 8.1.3 实验动物

见《白头翁皂苷的肠道菌群降解动力学研究》实验动物部分。

### 8.1.4 厌氧菌培养液和肠道孵育液的组成和制备

#### 8.1.4.1 厌氧菌培养液的组成和制备

见《白头翁皂苷的肠道菌群降解动力学研究》部分

#### 8.1.4.2 肠道孵育液的制备

见《白头翁皂苷的肠道菌群降解动力学研究》部分

### 8.1.5 白头翁总皂苷肠道孵育

取上述大鼠肠菌培养液50

mL，加白头翁

B3、BD、B7、B10、B11 各约5.0

mg，精密称定，混匀溶解，再将混匀的溶液分装37℃厌氧条件下培养24 h。

（1 mL/管），于



### 8.1.6 数据处理

运用Mass Hunter Analyst 1.2数据采集和处理系统和Agilent Metabolite ID软件进行数据处理。

## 8.2 分析方法的建立和验证

#### 8.2.1 分析方法的建立

##### 8.2.1.1 **HPLC**检测条件

色谱柱：Agilent Eclipse Plus C18 (1.8µm, 3.0 mm×100 mm);流动相：乙腈(A) -水(B)梯度洗脱，如Table8- 1；柱温：30.00°C；流速：0.3 mL·min-1；进样量：2.0µL。

Table 8- 1 Gradient condition

| time(min) | CH3CN(A)% | H2O(B)% |
| --- | --- | --- |
| 0 | 10 | 90 |
| 8 | 95 | 5 |
| 10 | 95 | 5 |
| 10.10 | 10 | 90 |
| 16 | 10 | 90 |

##### 8.2.1.2 **MS**检测条件

扫描方式：ESI负离子模式；离子喷雾电压，-3500 V；Fragmentor电压为130

V；干燥气流量为12 L·min-1，温度为350oC； 鞘气流量为12 L·min-1，温度为350oC；碎裂电压分别为20、35、50 V。总离子流全扫描的范围m/z: 100 ~ 1100。

##### 8.2.1.3 对照品溶液的制备

取白头翁B3、BD、B7、B10、B11对照品适量，精密称定，置10

mL量瓶中，加甲醇定容至刻度，得混合对照品溶液，浓度分别为0.250

mg·mL-1、0.235 mg·mL-1、0.245 mg·mL-1、0.249 mg·mL-1、0.225 mg·mL-1，置4℃保存。

##### 8.2.1.4 样品溶液的制备

同《白头翁皂苷的肠道菌群降解动力学研究》中“样品处理”项。



## 8.3 大鼠肠道菌群中白头翁皂苷及其代谢产物鉴定

### **8.3.1** 代谢产物分析

采用Metabolite ID软件将UHPLC-Q-TOF/MS采集的MS数据进行处理，再通过Agilent MassHunter软件对其MS和MS-MS图谱进行解析，最后在大鼠肠内菌培养液中寻找到8种B3代谢产物，7种BD代谢产物，8种B7代谢产物，7种B10代谢产物和9 种B11 代谢产物。见Table8- 2。

Table 8- 2 The analytes and the metabolites of analytes(a: B3; b: BD; c: B7; d: B10; e: B11)

a

Metabolit

Proposed

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| es of B3 |  | formula |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  | | | |
|  |  |  | |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

M/z [M-H] -

Biotransformation Fragment ions (m/z)

B3-M0 911.5010 C47H76O17 \_

B3-M1 749.4482 C41H66O12 Deglucose

B3-M2 765.4431 C41H66O13 Derhamnose

B3-M3 603.3902 C35H56O8 Deglucose+Derhamnose

Deglucose+Derhamnose+Dearabinos

947.6848,911.5091,879.6445,825.4763,76

5.3320,112.7034

Based on the parent skeleton

B3-M4 471.3480 C30H48O4

E Dihydroxylation+Methylation/Hydro

B3-M5 957.4977 C48H78O19 xylation+Methoxylation/Hydroxylati

on+Hydroxymethylation

Based on the metabolic rule

B3-M6 971.5261 C49H80O19 Dihydroxylation+Dimethylation/Dim 971.5261,911.5274,749.3525,603.3287,47



c

Metabolites

m/z [M-H]-

Proposed

Biotransformation

Fragment ions (m/z)

B7-M5

ose

Deglucose+carboxylation+Hydrox 793.4763,733.4513,635.4464,521.2929,473.21

793.4763 C43H70O13 ylation/Deglucose+Dihydroxylatio 75,391.2805,285.2065,248.9715,141.0162,112.

Deglucose+Dihydroxylation+Meth

ylation

733.4555,749.5023,765.6225

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | ethoxylation/Dihydroxymethylation | | 1.5214,191.3296,112.0454 |
| B3-M7 | 927.4979 | C47H76O18 | Hydroxylation | | 947.8978,927.4979,911.2121,112.9454 |
| B3-M8 | 941.5136 | C48H78O18 | Hydroxylation+Methylation | | 941.5136,911.2521,896.5208,112.0541 |
| b |  |  |  | |  |
| Metabolites | M/z [M-H]- | Proposed | Biotransformation | | Fragment ions (m/z) |
| Of BD |  | formula |  |  | |
| BD -M0 | 749.4482 | C41H66O12 | \_ | 749.3874,603.2487,471.2740,241.3256,112.0785 | |
| BD-M1 | 603.3902 | C35H56O8 | Derhamnose |  | |
|  |  |  |  | Based on the parent skeleton | |
| BD-M2 | 471.3480 | C30H48O4 | Derhamnose+Dearabinose |  | |
| BD-M3 | 587.4885 | C35H56O7 | Derhamnose+Dehydroxylation | 604.3252,587.4816,471.3254 | |
| BD-M4 | 781.4448 | C41H66O14 | Dihydroxylation | 781.4448,737.8541,693.1525 | |
| BD-M5 | 765.4452 | C41H66O13 | Hydroxylation | 911.5054,825.6671,765.4484,112.4454 | |
| BD-M6 | 733.4567 | C41H66O11 | Dehydroxylation | 733.4567,793.4784 | |
| BD-M7 | 779.4636 | C42H68O13 | Hydroxylation+Methylation | 779.4636,733.6625,112.4454 | |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Of B7 |  | formula |  |
| B7-M0 | 895.5061 | C47H76O16 | 895.4496,733.4329,587.5951,455.3516,59.014  \_ 2,101.0246,161.0456,205.0702,259.0233,338.4 |
|  |  |  | 060,391.2726 |
| B7-M1 | 733.4532 | C41H66O11 | Deglucose |
| B7-M2 | 749.4482 | C41H77O12 | Derhamnose |
| B7-M3 | 587.3953 | C35H56O7 | Deglucose+Derhamnose Based on the parent skeleton |
| Deglucose+Derhamnose+Dearabin | | | |
| B7-M4 | 455.3531 | C30H48O3 | |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| B7-M6 | 911.5030 | C47H76O17 |
| B7-M7 | 971.5239 | C48H76O20 |
| B7-M8 | 779.4605 | C42H68O13 |

|  |  |
| --- | --- |
| n+Dimethylation | 9856 |
|  | 911.5052,749.4493,603.3907,585.3764,549.37 |
| Hydroxylation | 48,499.3462,471.3504,423.3398,379.3723,343. |
|  | 2055,297.1186,141.0182,112.9858 |
| Hydroxylation+Acetic | 971.5239,911.5079,749.4288,603.3869,471.34 |
| acidification | 55,191.0555,112.9838,59.0142 |

d

Metabolites

Proposed

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| of B10 |  | formula |  |
| B10-M0 | 895.5061 | C47H76O16 | 895.5074,733.4580,587.3977,455.3527,59.0  145 |
| B10-M1 | 733.4532 | C41H66O11 | Deglucose |
| B10-M2 | 749.4482 | C41H77O12 | Derhamnose |
| B10-M3 | 587.3953 | C35H56O7 | Deglucose+Derhamnose Based on the parent skeleton |
| Deglucose+Derhamnose+Dearabi nose | | | |
|  |  |  | Deglucose+carboxylation+Hydro 793.4763,733.4513,635.4464,521.2929,473. |
| B10-M5 | 793.4763 | C43H70O13 | xylation/Deglucose+Dihydroxylat 2175,391.2805,285.2065,248.9715,141.0162 |
|  |  |  | ion+Dimethylation ,112.9856 |
| B10-M6 | 869.4989 | C45H74O16 | Didesmethylation+Reduction 895.1702,881.4364,883.2221,59.0137 |

M/z [M-H] -

Biotransformation Fragment ions (m/z)

\_



B10-M7

779.4614

C42H68O13

Deglucose+Dihydroxylation+Met

hylation

733.4555,749.5023,765.6225

e

Metabolites

m/z [M-H]-

Proposed

Biotransformation

Fragment ions

其中以下化合物由于准分子离子峰相同，色谱行为和质谱特征相同，故判断为相

同或相近的裂解方式和代谢规律。见 Table8- 3。

B10-M4 455.3531 C30H48O3

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Of B11 |  | formula |  | |
| B11-M0 | 733.4532 | C41H66O11 | \_ | 733.4594,587.3967,455.3541, 59.0146 |
| B11-M1  B11-M2 | 587.3953  455.3531 | C35H56O7  C30H48O3 | Derhamnose  Derhamnose+Dearabinose | Based on the parent skeleton |
| B11-M3 | 719.4393 | C40H64O11 | Demethylation | 793.4804,733.4594 |
| B11-M4 | 781.4448 | C41H66O14 | Trihydroxylation | 781.4448,737.8541,693.1525 |
| B11-M5 | 779.4634 | C42H68O13 | Dihydroxylation+Methylation | 733.4555,749.5023,765.6225 |
| B11-M6 | 737.4199 | C40H66O12 | Trihydroxylation+Decarboxylation | \_ |
| B11-M7 | 825.4714 | C42H66O16 | Trihydroxylation+Carboxylation | 781.4472 ,737.4185 |
| B11-M8 | 765.4445 | C41H66O13 | Dihydroxylation | 733.2021,749.2151,765.4486 |
| B11-M9 | 911.5069 | C47H76O17 | Glucose+Hydroxylation | 895.4405 |

Table 8- 3 The metabolites which present the same or similar chromatographic behaviors and mass features

M/z [M-H] -

749.44

Proposed

Metabolites Biotransformation Remarks

formula

Hydroxy is connected to

82

749.44

82

603.39

02

587.39

C41H66O12 B3-M1 BD -M0 C41H66O12 B7-M2 B10-M2 C35H56O8 B3-M3 BD-M1

\_

\_

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | 1 |  |
| C30H48O3 | B7-M4 | B10-M4 | B11-M2 | \_ |
| C41H66O11 | BD-M6 | B7-M1 | B10-M1 | B11-M0 |
| C42H68O13 | BD-M7 | B7-M8 | B10-M7 | B11-M5 |

\_ B11--M

\_ Sugar removed

\_ Sugar removed

\_ Sugar removed

C-23

Hydroxy connecting position is uncertain

\_

53

455.35

31

733.45

C35H56O7 B7-M3 B10-M3

\_ Sugar removed \_

Sugar removed \_



Except is

67

779.46

36

781.44

48

793.47

63

911.50

30

C41H66O14 BD-M4 B11-M4 \_

C43H70O13 B7-M5 B10-M5 \_

C47H76O17 B7-M6 B11-M9 \_

Sugar removed

Hydroxylation+Methylatio n

\_ Hydroxylation

Deglucose+carboxylation+ Hydroxylation/Deglucose+

\_

Dihydroxylation+Dimethyl

ation

\_ Hydroxylation

Dehydroxylation at the C-4 methyl on BD

One of hydroxy on BD is confirmed on the C-4 methyl

One of hydroxy on BD is confirmed at the C-4 methyl

Isomeride

\_

### 8.3.2 化合物鉴定

#### 8.3.2.1 **B3**及其代谢产物的鉴定

##### (1) B3-M0的鉴定

在0h的B3肠道孵育液中，准分子离子峰[M-H] -为m/z 911.5010, 对其进行LC-MS2分析得到主要碎片离子有m/z 947.6848, m/z 911.5091, m/z 879.6445, m/z 825.4763, m/z 765.3320, m/z 112.7034. 其中m/z 765.3320与B3的准分子离子峰相

比减少146 Da，为失去1 个鼠李糖的结果，B3-M0 的色谱行为和质谱数据与B3 对照品的完全一致，可以推测为未代谢完全的B3原型药物。如Fig.8- 1（a）。

##### (2) B3-M1—B3-M4

B3-M1, B3-M2, B3-M3, B3-M4为B3原型脱糖代谢的产物，在Q-TOF-MSn 的

色谱和质谱图中都能找到相应的数据支持，如Fig.8- 1(b, c, d, e)其结构式见Fig.8- 6（a）。

##### (3) B3-M5（m/z 957.4977）的鉴别

准分子离子峰[M-H] -为m/z 957.4977，与B3-M0相比，增加46 Da，综合考虑原型药物结构特点和相似药物体内代谢的规律，推测为B3的常春藤皂苷母核结构上发生2次羟基化和1次甲基化的结果，或者1次羟基化和1 次甲氧基化的结果，或者1次羟化，1次羟甲基化的结果。见Fig.8- 1（f）。



其结构推测见Fig.8- 6(a)。

##### (4) B3-M6 (m/z 971.5261)的鉴定

准分子离子峰[M-H] -为m/z 971.5261，对其进行LC-MS2 分析得到主要碎片离子有m/z 971.5261, m/z 911.5274, m/z 749.3525, m/z 603.3287, m/z 471.5214, m/z 191.3296, m/z 112.0454，与B3-M0 相比，增加60 Da，推测可能为有三种代谢方式：

1次羟化和2次甲基化，或者2次甲氧基化，或者为2次羟甲基化。见Fig.8- 1（g）。其结构推测见Fig.8- 6（a）。

##### (5) B3-M7（m/z 927.4979）的鉴定

准分子离子峰[M-H] -为m/z 927.4979，对其进行LC-MS2 分析得到主要碎片离子有m/z 947.8978, m/z 927.4979, m/z 911.2121, m/z 112.9454，与B3-M0相比，增加16 Da，恰好与一个O原子分子量一致，综合考虑原型药物结构特点和相似药物体内代谢的规律，推测为B3被羟化的产物，虽文献报道C-7位是较易引入羟基的位点，但本次实验数据并不足以说明该羟基化发生在C-7，故引入羟基位置不确定。见Fig.8- 1（h）。

其结构式推测见Fig.8- 6(a)。

##### (6) B3-M8 (m/z 941.5136)的鉴定

准分子离子峰[M-H] - 为m/z 941.5136，对其进行LC-MS2分析得到主要碎片离子有m/z 941.5136, m/z 911.2521, m/z 896.5208, m/z 112.0541等，与B3-M0相比，增

加30 Da，根据皂苷代谢规律，为1次羟基化和1次甲基化的产物，见Fig.8- 1（i）。

其结构式推测见Fig.8- 6(a)。

**3-**



**a.B**

**M0**

**b.**

**M**

**c. B3-M2**

**B3-**

**1**



**d. B3-M3**



**e. B3-M4**

**f. B3-M5**

**g.B**

**3-**

**M6**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | **h.** | **B3-** | **M7** |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

**ⅰ. B3-M8**

Fig.8- 1 MS2 spectrum of typical metabolites of B3uder negative model with ESI source (a: B3-M0;

B: B3-M1; c: B3-M2; d: B3-M3; e: B3-M4; f: B3-M5; g: B3-M6; h: B3-M7; i: B3-M8)

#### 8.3.2.2 **BD**及其代谢产物的鉴定

##### (1) BD-M0的鉴定

在0h的BD肠道孵育液中，准分子离子峰[M-H] -为m/z 749.4482，对其进行LC-MS2分析得到主要碎片离子有m/z 749.3874, m/z 603.2487, m/z 471.2740, m/z 241.3256, m/z 112.0785. BD-M0的色谱行为和质谱数据与BD对照品的完全一致，可以推测为未代谢完全的BD原型药物，见Fig.8- 2(a)。

##### (2) BD-M1和BD-M2

BD-M1和BD-M2为BD 原型脱糖代谢的产物，在Q-TOF-MSn 的色谱和质谱图中都能找到相应的数据支持，见Fig.8- 2(b, c)，其结构式见Fig.8- 6（b）。

##### (3) BD-M3(m/z 587.4885)的鉴定



准分子离子峰[M-H] -为m/z 587.4885，对其进行LC-MS2 分析得到主要碎片离子有m/z 604.3252, m/z 587.4816, m/z 471.3254，其中m/z 471.3254为常春藤皂苷的准分子离子峰，为BD的母核结构，m/z 604.3252为BD去掉一个鼠李糖，而该碎片离子比m/z 604.3252的准分子离子峰少16 Da，为BD 去掉1 个鼠李糖后再发生1次去羟基化的结果，见Fig.8- 2(d)。

其结构式推测见Fig.8- 5(b)。

##### (4) BD-M4（m/z 781.4448）的鉴定

准分子离子峰[M-H] -为m/z 781.4448，对其进行LC-MS2 分析得到主要碎片离子有m/z 781.4448, m/z 737.8541, m/z 693.1525，根据皂苷代谢规律，为BD发生

2次羟基化的结果，见Fig.8- 2（e）。其结构式推测如Fig.8- 6（b）。

##### (5) BD-M5 (m/z 765.4452)的鉴定

准分子离子峰[M-H] -为m/z 765.4452，对其进行LC-MS2分析得到主要碎片离子有m/z 911.5054, m/z 825.6671, m/z 765.4484, m/z 112.4454，与BD-M0相比，

增加16 Da，与BD-M4 (m/z 781.4448)相比，减少16 Da，推测为BD发生1次羟基化的结果，见Fig.8- 2(f)。

结构式推测见Fig.8- 6(b)。

##### (6) BD-M6(m/z 733.4567)的鉴定



准分子离子峰[M-H] -为m/z 733.4567，对其进行LC-MS2分析得到主要碎片离子有m/z 733.4567, m/z 793.4784等，与BD-M0相比，减少16 Da，其为BD发生1 次羟基化的产物，即B11，见Fig.8- 2(g)。

其结构式见Fig.8- 6(b)。

##### (7) BD-M7（m/z 779.4636)的鉴定

准分子离子峰[M-H] -为m/z 779.4636，对其进行LC-MS2分析得到主要碎片离子有m/z 779.4636, m/z 733.6625, m/z 112.4454等，与BD-M0相比，增加30 Da，与BD-M5 (m/z 765.4452)相比，增加14 Da，综合考虑原型药物结构特点和相似药物体内代谢的规律，其为BD经过1次羟化和1次甲基化的产物，见Fig.8- 2(h). 结构式推测见Fig.8- 6(b)。

**a. BD-M0**

**b.B**

**D-**



**M1**

**M2**

**d. BD-M3**

**c.**

**BD-**

**e. BD-M4**

**f. BD-M5**



**g.BD-M6**

**h.BD-M7**

Fig. 8- 2 MS2 spectrum of typical metabolites of BD uder negative model with ESI source (a: BD-M0;

B: BD-M1; c: BD-M2; d: BD-M3; e: BD-M4; f: BD-M5; g: BD-M6; h: BD-M7)

#### 8.3.2.3 **B7**及其代谢产物的鉴定

（1）B7-M0（m/z 895.5061）鉴定

在0h的B7肠道孵育液中，准分子离子峰[M-H] -为m/z 895.5061, 对其进行LC-MS2 分析得到主要碎片离子有m/z 895.4496, m/z 733.4329, m/z 587.5951, m/z

455.3516, m/z 59.0142, m/z 101.0246, m/z 161.0456, m/z 205.0702, （文献Re）m/z



259.0233, m/z 338.4060, m/z 391.2726. B7-M0的色谱行为和质谱数据与B7对照品的完全一致，可以推测为未代谢完全的B7原型药物，见Fig.8- 3(a)。

(1) B7-M1—B3-M4的鉴定

B7-M1, B7-M2, B7-M3, B7-M4为B7原型脱糖代谢的产物，在Q-TOF-MSn 的

色谱和质谱图中都能找到相应的数据支持，见Fig.8- 3(b, c, d, e)，其结构式见Fig.8- 6（c）。

（3）B7-M5（m/z 793.4763）的鉴定：

准分子离子峰[M-H] -为m/z 793.4763，对其进行LC-MS2 分析得到主要碎片离子有 m/z 793.4763, m/z 733.4513, m/z 635.4464, m/z 521.2929, m/z 473.2175, m/z

391.2805, m/z 285.2065, m/z 248.9715, m/z 141.0162, m/z 112.9856.

LC-MS2 二级碎片离子m/z 733.4513，为B11 的准分子离子峰，m/z 793.4763 比其增加60 Da，推测为1次羧化和1次羟化；或者为2次羟化和2次甲基化，见Fig.8- 3(f)。

其结构式推测见Fig.8- 6（c）。

(4) B7-M6(m/z 911.5030)的鉴定

准分子离子峰[M-H] -为m/z 911.5030，对其进行LC-MS2分析得到主要碎片离子有m/z 911.5052, m/z 749.4493, m/z 603.3907, m/z 585.3764, m/z 549.3748, m/z

499.3462, m/z 471.3504, m/z 423.3398, m/z 379.3723, m/z 343.2055, m/z 297.1186, m/z

141.0182, m/z 112.9858, 与白头翁皂苷B3标准品对照图谱一致，m/z 749.4493为m/z

911.5030去掉1个葡萄糖的结果，m/z 603.3907为脱去1个葡萄糖，接着再脱去1个鼠李糖的结果。所以准分子离子峰m/z 911.5030为B7苷元环上甲基羟化后产物，见Fig.8- 3（g）。

分子结构如见Fig.8- 6(c)。

(5) B7-M7(m/z 971.5239)的鉴定

准分子离子峰[M-H] -为m/z 971.5239，对其进行LC-MS2 分析得到主要碎片离子有m/z 971.5239, m/z 911.5079, m/z 749.4288, m/z 603.3869, m/z 471.3455, m/z



191.0555, m/z 112.9838, m/z 59.0142, 根据二级碎片离子m/z 911.5239可知为B7羟化产物，m/z 59.0142为醋酸的准分子离子锋，故m/z 911.5239为B7发生羟化后再发生醋酸化的产物，见Fig.8- 3(h)。

其结构式推测见Fig.8- 6(c)。

(6) B7-M8(m/z 779.4605)的鉴定

准分子离子峰[M-H] -为m/z 779.4605，对其进行LC-MS2分析得到主要碎片离子有m/z 733.4555, m/z 749.5023, m/z 765.6225, 其中m/z 733.4555的丰度很高，

m/z 733.4555与m/z 749.5023相比，相差16 Da，为增加1个O原子的结果，m/z

749.5023与m/z 765.6225相差16 Da，为增加1个O原子的结果，m/z 765.6225与m/z 779.4614相差14 Da，为增加一个-CH2-的结果，由此推测，m/z 779.4614为B7去掉1个葡萄糖，再发生2次羟化，及1次甲基化的产物，但羟化和甲基化的位置不能确定，见Fig.8- 3(i)。

其结构式推测见Fig.8- 6(c)。

**M**

**a.B**

**7-**

**0**

**b. B7-M1**

**c. B7-**

**M2**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | |  | |  | |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | |  | |  |  |
| **d.** | **B7-** | | **M3** | |  | |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | |  | |  |  |
|  |  | |  |  |  | |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | |  | |  |  |
|  |  | |  |  |  | |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | |  | |  |  |
|  |  | |  |  |  | |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | |  |  |  |  |
|  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

**e.**

**B7**



**f. B7-M5**

**-M**

**4**



**B7**

**M6**

**M**

**g.**

**-**

**h**

**.B**

**7-**

**7**

**i.B**

**7**

**-M**

**8**

Fig. 8- 3 MS2 spectrum of typical metabolites of B7 uder negative model with ESI source (a: B7-M0; b: B7-M1; c: B7-M2; d: B7-M3; e: B7-M4; f: B7-M5; g: B7-M6; h: B7-M7; i: B7-M8)

#### 8.3.2.4 **B10**及其代谢产物的鉴定

##### (1) B10-M0(m/z 895.5061)的鉴定

在0h的B10肠道孵育液中，准分子离子峰[M-H] -为m/z 895.5061，对其进行LC-MS2分析得到主要碎片离子有m/z 895.5074, m/z 733.4580, m/z 587.3977, m/z 455.3527, m/z 59.0145. 其中m/z 733.4580 为B10失去1 个葡萄糖基的结果，m/z

587.3977 与m/z 733.4580 相比减少146 Da，为再次失去1 个鼠李糖基的结果，

m/z 455.3527与m/z 587.3977相比减少132 Da，为再次失去1个阿拉伯糖基的结

果，即为齐墩果酸苷元。B10-M0的色谱行为和质谱数据与B10对照品的完全一致，可以推测为未代谢完全的B10原型药物，见Fig.8- 4（a）。

##### (2) B10-M1—B10-M4的鉴定

B10-M1, B10-M2, B10-M3, B10-M4 为B10 原型脱糖代谢的产物， 在

Q-TOF-MSn的色谱和质谱图中都能找到相应的数据支持，Fig.8- 4(b, c, d, e)，其结构式见Fig.8- 6（d）。

##### (3) B10-M5(m/z 793.4763)的鉴定

准分子离子峰[M-H] -为m/z 793.4763，对其进行LC-MS2 分析得到主要碎片离子有m/z 793.4763, m/z 733.4513, m/z 635.4464, m/z 521.2929, m/z 473.2175, m/z

391.2805, m/z 285.2065, m/z 248.9715, m/z 141.0162, m/z 112.9856.



LC-MS2二级碎片离子m/z 733.4513, 为B11的准分子离子峰，m/z 793.4763比其增加60 Da，推测为1次羧化和1次羟化；或者为2次羟化和2次甲基化，见Fig.8- 4(f)。

其结构式推测见Fig.8- 6（d）。

##### (4) B10-M6（m/z 869.4989）的鉴定

准分子离子峰[M-H] -为m/z 869.4989，对其进行LC-MS2 分析得到主要碎片离子有m/z 895.1702, m/z 881.4364, m/z 883.2221, m/z 59.0137. 其中m/z 895.1702 为

B10 的准分子离子峰，m/z 881.4364 比m/z 895.1702 少14 Da，为失去1 个-CH2-的结果，m/z 883.2221比m/z 881.4364大2 Da，可能为环上双键还原的结果，m/z 869.4989比m/z 883.2221少14 Da，为再失去1个-CH2-的结果，故869.4989 为

2次去甲基化和1次双键还原的产物，见Fig.8- 4（g）。其结构式推测见Fig.8- 6（d）。

##### (5) B10-M7（m/z 779.4614）的鉴定

准分子离子峰[M-H] -为m/z 779.4614，对其进行LC-MS2分析得到主要碎片离子有m/z 733.4555, m/z 749.5023, m/z 765.6225, 其中m/z 733.4555的丰度很高，

m/z 733.4555与m/z 749.5023相比，相差16 Da，为增加1个O原子的结果，m/z

749.5023与m/z 765.6225相差16 Da，为增加1个O原子的结果，m/z 765.6225

与m/z 779.4614 相差14 Da，为增加一个-CH2-的结果，由此推测，m/z 779.4614

为B10去掉1个葡萄糖，再发生2次羟化，及1 次甲基化的产物，但羟化和甲基化的位置不能确定，见Fig.8- 4（h）。

其结构式推断见Fig.8- 6(d)。

**a. B10-M0**



**b. B10-M1**



**B10-**

**c**

**.**

**M2**

**10-**

**d.**

**B**

**M3**

**e.B**

**10-**

**M**

**4**

**B10-**

**f.**

**M5**

**g. B10-M6**



**h.B10-M7**

Fig. 8- 4 MS2 spectrum of typical metabolites of B10 uder negative model with ESI source (a: B10-M0; b: B10-M1; c: B10-M2; d: B10-M3; e: B10-M4; f: B10-M5; g: B10-M6; h: B10-M6)

#### 8.3.2.5 **B11**及其代谢产物的鉴定

##### (1) B11-M0（m/z 733.4532）的鉴定

在0h的B11肠道孵育液中，准分子离子峰[M-H] -为m/z 733.4532，对其进行LC-MS2分析得到主要碎片离子有m/z 733.4594, m/z 587.3967, m/z 455.3541, m/z 59.0146. m/z 587.3967与m/z 733.4594相比减少146 Da，为失去1个鼠李糖基



的结果，m/z 455.3541与m/z 587.3967相比减少132 Da，为再次失去1个阿拉伯糖基的结果，即为齐墩果酸苷元。B11-M0的色谱行为和质谱数据与B11对照品的完全一致，可以推测为未代谢完全的B11原型药物，见Fig.8- 5（a）。

##### (2) B11-M1—B11-M2的鉴定

B11-M1, B11-M2为B11原型脱糖代谢的产物，在Q-TOF-MSn的色谱和质谱图中都能找到相应的数据支持，见Fig.8- 5(b, c)，其结构式见Fig.8- 6（e）。

##### (3) B11-M3(m/z 719.4393)的鉴定

准分子离子峰[M-H] -为m/z 719.4393，对其进行LC-MS2分析得到主要碎片离子有m/z 793.4804, m/z 733.4594 等，其中m/z 733.4594 的丰度很高，由于m/z

719.4393与m/z 733.4594相比，减少14 Da，故可以判断B11去掉一个-CH2-的结果，去掉甲基的位置不确定，见Fig.8- 5(d)。

其结构式推测见Fig.8- 6(e)。

##### (4) B11-M4(m/z 781.4448)的鉴定

准分子离子峰[M-H] -为m/z 781.4448，对其进行LC-MS2 分析得到主要碎片离子有m/z 781.4448, m/z 737.8541, m/z 693.1525，根据m/z 781.4448与B11的准分子离子峰相比，增加48 Da，根据原型药物结构特点和相似药物体内代谢的规律，可知其为B11的基础上3次羟化的结果，羟化位置不确定，见Fig.8- 5（e）。

其结构式推测见Fig.8- 6(e)。

##### (5) B11-M5 (m/z 779.4634)的鉴定

准分子离子峰[M-H] -为m/z 779.4634，对其进行LC-MS2分析得到主要碎片离子有m/z 733.4555, m/z 749.5023, m/z 765.6225, 其中m/z 733.4555的丰度很高，

m/z 749.5023与m/z 733.4555相比，相差16 Da，为增加1个O 原子的结果，m/z

765.6225与m/z 749.5023相差16 Da，为增加1个O原子的结果，m/z 779.4614与m/z 765.6225相差14 Da，为增加一个-CH2-的结果，由此推测，m/z 779.4614为B11发生2次羟化，及1次甲基化的产物，但羟化和甲基化的位置不能确定，见Fig.8- 5(f)。

其结构式见Fig.8- 6(e)。

##### (6) B11-M6(m/z 737.4199)的鉴定



准分子离子峰[M-H] - 为m/z 737.4199, m/z737.4199比m/z 781.4448减少

44 Da，可以推断其为脱羧的产物，即减少-COO-的结果，见Fig.8- 5（g）。其结构式推测见Fig.8- 6（e）。

##### (7) B11-M7(m/z 825.4714)的鉴定

准分子离子峰[M-H] -为m/z 825.4714，对其进行LC-MS2分析得到主要碎片离子有m/z 781.4472, m/z 737.4185等，由于m/z 825.4714比m/z 781.4472增加44 Da，故推断为m/z 781.4472的基础上在苷元上发生羧化，见Fig.8- 5(h)。

其结构是推断见Fig.8- 6(e)。

##### (8) B11-M8(m/z 765.4445)的鉴定

准分子离子峰[M-H] -为m/z 765.4445，对其进行LC-MS2分析得到主要碎片离子有m/z 733.2021, m/z 749.2151, m/z 765.4486等，各二级碎片离子之间相差16 Da，故推测为B11 发生2次羟化的产物，见Fig.8- 5(i)。

其结构式推测见Fig.8- 5(e)。

##### (9) B11-M9(m/z 911.5069)的鉴定

准分子离子峰[M-H] -为m/z 911.5069，对其进行LC-MS2分析得到主要碎片离子有m/z 895.4405，结合B7, B10的结构信息，m/z 911.5069在m/z 895.4405的基础上增加16 Da，与B7-M5 (m/z 911.5030)的准分子离子峰相近，但由于LC-MS2信息不同，连接位置应不同，即为苷元上的羟化，羟化位置不确定，见Fig.8-

5(j)。

其结构式推测见Fig.8- 6(e)。

**g**

**.B1**

**1-**

**a.**

**B11**

**-**

**M0**



**1-**

**b.**

**B1**

**M1**



|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | **c.B** | **11-** | **M2** | |  |  |  |  |  |  |  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

**d**

**.B1**

**1-**

**M3**

**e. B11-M4**



**B11**

**-**

**f.**

**M5**

**M6**



**h.B11-M7**



**i.B**

**11**

**-**

**M8**



**j.B11-M9**

Fig.8- 5 MS2 spectrum of typical metabolites of B11 uder negative model with ESI source (a: B11-M0;, b: B11-M1;, c: B11-M2;, d: B11-M3;, e: B11-M4;, f: B11-M5;, g: B11-M6;, h: B11-M7;, i: B11-M8;,

j. B11-M9)



### **8.3.3** 大鼠含肠道孵育液中白头翁皂苷**B3**、**BD**、**B7**、**B10**、**B11**代谢途径

根据1.3.1中代谢产物的分析，可知B3、BD、B7、B10、B11 的代谢途径，如

Fig.8- 6.

**M5**



**-rha**

**M1**

**m/z 749.4482**

**m/z 603.3902**

**-glu**

**-glu**

**+O**

**-rha**

**+CH2**

**M7**

**m/z 927.4979**

**B3-M0**

**+2×O+CH2 m/z 911.5010**

**or +O+OCH2 or +O+CHOH**

**+2×OCH2**

**or +2×CHOH**

**or +2×O+2×CH2**

**M2**

**m/z 765.4431**

**+O**

**+CH2**

**M8**

**m/z 941.5136**

**or**

**or**

**M5**

**m/z 957.4977**

**M6**

**m/z 971.5261**

**BD**

**+2×O+CH2**

**M7**

**m/z 779.4636**

**M6**

**m/z 733.4567**

**M2**

**m/z 471.3480**

**-O**

**-ara**

**-rha**

**+O**

**BD-M0 m/z 749.4482**

**-O**

**M1**

**m/z 603.3902**

**+O**

**M4**

**m/z 781.4448**

**M5**

**m/z 765.4452**

**M3**

**m/z 587.4885**

**B3**



**M4**

**m/z 471.348**

**-ara**

**M3**

**B7**

**M4**

**M/z 455.3531**

**-ara**

**-glu**

**M7** **M2** **M3**

**+CH3COOH**

**M/z 971.5239**

**-rha**

**M/z 749.4482** **m/z 587.3953**

**-rha**

**-rha**

**B7-M0**

**+O**

**M6**

**M/z 911.5030**

**B7-M0 m/z 895.5061**

**-glu**

**M1**

**M/z 733.4532**

**-glu+2×O+CH2**

**Or -rha+O+CH2**

**-glu+2×O+2×CH**2

**Or -glu+CO2+O**

**+2×O+2×CH2 or +CO2+O**

**+CH2**

**M8**

**M/z 779.4605**

**M5**

**Or** **m/z 793.4763**

**B10**

**M4**

**M/z 455.3531**

**-ara**

**M7**

**M/z 779.4614**

**-glu**

**M2**

**M3**

**M/z 587.3953**

**+CH2**

**M/z 749.4482**

**-rha** **-rha**

**-glu+2×O+2×CH2**

**Or -glu+CO2+O**

**or**

**-2×CH2+2H**

**B10-M0**

**M/z 895.5061**

**-glu**

**M1**

**M/z 733.4532**



**M5**

**M/z 793.4763**

**M6**

**M/z 869.4989**

**+2×O+2×CH2**

**M5** **M3** **M9**

**+CH2**

**M/z 779.4634**

**-CH2**

**M/z 719.4393**

**M/z 911.5069**

**2×O**

**M8**

**B11-M0 -CO2+3×O M6**

**m/z 765.4445**

**M**76**8**5

**+O**

**M/z 733.4594**

**+3×O+CO2**

**M/z 737.4199**

**+CO2**

**M4**

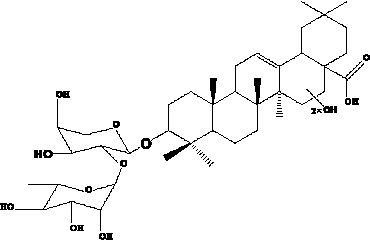
**M/z 781.4448**

**M7**

**M/z 825.4714**

**-ara**

**M1 m/z 587.3953**



**M2**

**M/z 455.3531**

Fig. 8- 6 The potential metabolic pathway of the analytes(a, B3; b, BD; c, B7; d, B10; e, B11)

## 8.4 讨论

### 8.4.1 白头翁皂苷代谢主要代谢途径

从Fig.8- 6 可以看出，5 种白头翁皂苷皂苷在酶系的作用下均主要发生3-位侧链脱糖代谢，苷元母核上羟化，羧化和脱羧，甲基化和去甲基化等代谢反应。呈现出相似的代谢规律。这与文献报道的肠道菌群对天然苷类成分的代谢规律一致[1]。

其中，脱糖基化、脱羧化是齐墩果烷型三萜皂苷类成分在体内的显著代谢途径。这与课题组前期对齐墩果烷类皂苷的构效关系研究结果相吻合，即C-28位羧酸和C-3位侧链是抗肿瘤活性的必需基团，脱糖基化与脱羧化代谢路径正是发生在这两个位点，以上结果提示这类代谢产物可能是白头翁皂苷的生物活性成分，是其生物利用度低，同时抗肿瘤疗效确切的潜在原因。这与文献报道的其他三萜皂苷类成分经由肠道菌群、生物酶系转化为苷元而产生生物活性[6]相一致。

### 8.4.2 白头翁皂苷的肠道菌群代谢

由于皂苷类物质在体内代谢转化器和酶系的多样性作用下，其代谢产物在体内的

浓度较低，而大量文献研究表明皂苷类成分主要在肠道菌群中被代谢[2,7,8,9]，所以皂苷类物质多采用体外肠道孵育为典型代谢研究方式。该方法能在短时间内得到大量代谢产物，迅速解决一些复杂的药物代谢研究中的问题，同时可以比较方便的控制某些代谢条件，代谢体系比较纯洁，易于对代谢物进行分离、提取，尽快确定药物代谢途径和代谢结构变化情况，尤其在代谢物结构鉴定方面具有较大的优越性[10]，故本实验采用体外温孵法研究白头翁皂苷在模拟体内环境中的代谢情况。结果显示，30小时内，正常大鼠肠内菌在实验条件下能有效代谢B3、BD、B7、B10、B11，大鼠肠内菌培养液中存在B3及其8个代谢产物、BD及其7个代谢产物、B7及其8个代谢产物、B10及其7个代谢产物、B11 及其9个代谢产物。



参考文献

[1] 程晓华, 熊玉卿. 五环三萜皂苷的药代动力学研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2008, 24(5): 443-445.

[2] 张怡红. 离体培养的肠道菌群对黄山药总皂苷的代谢研究[D]. 广州: 广东药学院, 2008.

[3] 赵雷, 陈昕, 陈晓. 肠内菌群对人参皂苷Rb1的代谢特点[J]. 长春: 长春中医学院学报, 2004, 20(1): 45-46, 49.

[4] 陈昕, 周秋丽, 王本祥. 人参皂苷Rb1的肠内菌代谢[J]. 药学学报, 1999, 34(6): 410-414.

[5] 张钰哲. 离体大鼠肠内菌群对知母甾体皂苷代谢研究[J]. 大理学院学报, 2012, 11(3): 5-8.

[6] Han M, Sha X, Wu Y, et al. Oral absorption of ginsenoside Rb1 using in vitro and in vivo models [J]. Planta Med, 2006, 72(5): 398-404.

[7] 张怡红. 离体培养的肠道菌群对黄山药总皂苷的代谢研究[D]. 广州: 广东药学院, 2008.

[8] 陈昕, 周秋丽, 王本祥. 人参皂苷Rb1的肠内菌代谢[J]. 药学学报, 1999, 34(6): 410-414.

[9] 张钰哲. 离体大鼠肠内菌群对知母甾体皂苷代谢研究[J]. 大理学院学报, 2012, 11(3): 5-8.

11(3): 5-8.

[10] Ha Y W, Na Y C, Ha I J, et al. Liquid chromatography/mass spectrometry-based structural analysis of new platycoside metabolites transformed by human intestinal bacteria [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 51(1): 202-209

结论白头翁皂苷主要活性成分的药代动力学研究

结论

**1**、

根据白头翁皂苷的分子结构特点和其在不同生物样品中的含量，利用现代HPLC-ELSD，RRLC-MS/MS检测手段，分别建立了适合生物样品中白头翁皂苷含量测定的分析方法。方法均具有快速、准确、灵敏度较高的特点，能够满足生物样品分析过程对方法高选择性、高灵敏度、高准确度、宽线性范围和高通量测试的要求。

**2**、

应用已建立的方法首次对5种白头翁皂苷在大鼠体内的药代动力学及绝对生物利用度进行研究。结果表明：大鼠口服白头翁皂苷均匀分散混悬液后，该类齐墩果酸型皂苷在体内快速吸收，0.33 (B3), 0.37 (BD), 0.5 (B7, B10, B11) h后血浆中药物含量达到峰值，服药24 h后皂苷已基本代谢完全。该类皂苷的绝度生物利用较低，均低于

2.5%。药动学研究结果提示白头翁皂苷在口服给药方式下虽然吸收较迅速，但总体较难吸收，代谢较快。



**3**、

采用在体单向灌流技术对白头翁皂苷小肠吸收情况的考察。药物的主要吸收部位为十二指肠，5种白头翁皂苷在十二指肠的的吸收速率常数(*Ka*)为(6.82±1.99)×10-5 min-1 ~ (0.62±0.17)×10-5 min-1之间，渗透系数(*Peff*)为(1.01±0.40)×10-5

cm·min-1 ~ (2.22±0.83)×10-5 cm·min-1,为低渗透药物类型；白头翁皂苷不完全依赖浓

度梯度转运，细胞膜上的载体蛋白参与了药物的转运过程，其小肠吸收机制并不完全为被动转运；细胞膜上的载体蛋白参与了药物的吸收和转运，P-gp的存在可降低白头翁皂苷的小肠吸收量，降低药物的生物利用度。结果提示：口服给予白头翁及其制剂时，可同时服用P-gp抑制剂，是提高该类皂苷的口服吸收率的一种方法。

**4**、

300 mg·kg-1单剂量灌胃给予大鼠白头翁皂苷均匀分散混悬液后，5 种皂苷成分在大鼠体内组织分布情况的考察。结果表明，药物在动物体内的分布迅速且广泛，给药仅15 min后，各组织脏器中即可检测到较高水平的药物浓度。各器官中皂苷的药物浓度最大值出现在30 ~ 45 min，给药后，药物主要分布在心脏，肝，肺，肾，小肠等器官，提示该药物可能对以上各器官症有较好的疗效。在大鼠脑中亦检测到药物的

白头翁皂苷主要活性成分的药代动力学研究结 论

存在，说明该药物可透过血脑屏障，提示白头翁皂苷类化合物可能具有较好的神经系统疾病的相关治疗作用。同时5种皂苷成分在大鼠体内排泄结果提示大部分药物未被吸收，直接以原型形式由粪便排出体外；被动物机体吸收的部分，推测在体内大部分也已被代谢掉，以代谢产物的形式排出体外。

**5**、

采用HPLC-ELSD、UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS及Mass Hunter Analyst 1.2和Metabolite ID数据自动处理系统对白头翁皂苷肠道代谢情况的考察。白头翁总皂苷在大鼠肠内菌的作用下被显著代谢，原型的消除行为符合一级降解动力学特征。5种白头翁皂苷在体外肠道代谢产物共计40种。确证出该类成分在肠内菌群的作用下主要发生3-位侧链脱糖代谢，苷元母核上羟化，羧化和脱羧，甲基化和去甲基化等代谢反应。



通过以上系统研究，阐明了白头翁皂苷的体内吸收、分布、代谢和排泄的基本规律以及绝对生物利用度，探索并发现了其生物利用度较低的多种因素，药代动力学的研究结果与课题组前期的抗肿瘤药效学结果互为补充，为合理阐述白头翁皂苷的作用机制提供依据，并为下一步对合理设计白头翁皂苷制剂提供科学数据与必要信息。

攻读博士期间发表的论文白头翁皂苷主要活性成分的药代动力学研究

# 攻读博士期间发表的论文

1. Yali Liu, Yonggui Song, Qiongming Xu, Dan Su, Yulin Feng, Xiang Li, Ikhlas A. Khan, Ling Zhang, Lanying Chen, Shilin Yang. Validated rapid resolution LC-ESI–MS/MS method for simultaneous determination of five pulchinenosides from *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel in rat plasma: Application to pharmacokinetics and bioavailability studies[J]; *Journal of Chromatography B*, 2013,942–943:141–150.

2. Yonggui Song, Dan Su, Tulin Lu, Chunqin Mao, De Ji, Yali Liu, Binbin

Wei, Ronghua Fan. Differential pharmacokinetics and the brain distribution of morphine and ephedrine constitutional isomers in rats after oral administration with Keke Capsule using rapid-resolution LC–MS/MS[J], *Journal of Separation science*,2013,37:352-359.



4.刘亚丽，熊贤兵，苏丹，宋永贵，张凌，杨世林.丰城鸡血藤中刺芒柄花素的大鼠

肠吸收研究[J];*中国中药杂志,*2013,38(20):3571-3575.

3.苏丹，孙君凯，刘亚丽，魏斌斌，耿璐璐，宋永贵.手性药物肌肽的研究进展[J]；中国新药杂志，2012,2(5)：518-511.

白头翁皂苷主要活性成分的药代动力学研究缩略词表

# 缩略词表

PRS *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel Saponin

A, D, M, E Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion rha: α-L-rhamnopyranosyl

Glc: β-D-glucopyranosyl

Ara: α-L-arabinopyranosyl

P-gp: P-glycoprotein

*Ka:* Absorption constant

*Peff:* Permeability Coefficient

MD: Madecassoside

CID: Collision Induced Dissociation EDTA: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid RSD: Relative Standard Deviation



m/s: Mass-to-charge-ratio

po: peros

iv: intravenous

ig: intragastric

SPE: Solid-Phase Extraction

LLE: Liquid-Liquid Extration

PPT: Protein Precipitation

IS: Internal Standard

HPLC: High Pressure Liquid Chromatography RRLC: Rapid Resolution Liquid Chromatography

UHPLC: Ultra High Performance Liquid Chromatography MPLC: Medium Pressure Liquid Chromatography SIM: Selective Ion Monitoring

ESI: Electron Spray Ionization

MRM: Multiple Reaction Monitor

MS: Mass Spectroscopy

DAD: Diode Array Detector

UVD: Ultravioletdetector

Q-TOF: Quadrupole-Time of Flight

1H-NMR: 1H-Nuclear Magnetic Resonance

13C-NMR: 13C-Nuclear Magnetic Resonance

致谢白头翁皂苷主要活性成分的药代动力学研究

致谢

衷心感谢导师杨世林教授多年来给予我的辛勤培育和悉心教导，感谢导师为我创造的宽松的科研环境和提供的充足的科研资金保障。

真诚地感谢苏丹副教授四年来在学习上所给予的指导和支持，在此论文完成之际，衷心地表示最真挚的感谢和深深的敬意！

诚挚感谢许琼明教授、冯育林教授、薄涛工程师、李笑然教授、张凌教授、宋永贵老师和闫星博士在实验和论文撰写过程中的悉心指导和帮助。

感谢江西中医药大学科技学院为我提供的学习机会和空间。



感谢江西中医药大学中药固体制造技术国家工程研究中心的各位老师在实验期间给予的诸多帮助与支持。

感谢协助我完成本论文的师弟师妹们。

感谢一直以来对我的学业给予关心、支持和鼓励的家人和朋友们！

最后，感谢百忙之中对我的论文进行精心审阅的各位老师，并感谢答辩委员会的各位老师不吝赐教。