【简报】

人参皂苷 CK 在正常大鼠和大脑中动脉阻断模型大鼠体内药物代谢动力学比较研究

许　杉[1,2]，胡端端[1,2]，陈　瑞[1,2]，徐智儒[1,2]，刘　莉[1,2*]
（1. 中国医药工业研究总院上海医药工业研究院创新药物与制药工艺国家重点实验室，上海 200437；
2. 上海市生物物质成药性评价专业技术服务中心，上海 200437）

摘要：目的　建立一种高灵敏度的液相色谱 - 质谱 / 质谱联用（LC-MS/MS）法测定人参皂苷 CK 在大脑中动脉阻断（MCAO）模型大鼠体内的含量，研究口服给药后大鼠体内的药物代谢动力学参数变化，为人参皂苷 CK 对脑神经保护以及抗炎作用奠定理论基础。**方法**　正常大鼠及 MCAO 模型大鼠 100 mg/kg 人参皂苷 CK 单次灌胃给药后于不同时间取血及脑组织。大鼠血浆及脑组织匀浆后均采用蛋白沉淀法进行样品前处理，并构建 LC-MS/MS 法对人参皂苷 CK 进行检测。采用 DAS 2.0 软件的非房室模型计算大鼠给药后的药物代谢动力学参数以及 MCAO 模型大鼠给药后不同时间点血浆及脑组织的药物浓度。**结果**　人参皂苷 CK 在 1 ～ 500 ng/ml 范围内线性关系良好，最低定量下限为 1 ng/ml，日内、日间精密度小于 13.6%，准确度偏差范围为 −5% ～ 13.4%。与正常大鼠相比较，MCAO 模型大鼠血浆 $t_{1/2}$ 更长［(2.5±1.1) h 对 (11.0±10.9) h］，AUC 值更大［(14 944±2 170) ng/ml·h 对 (28 882±11 119) ng/ml·h］；MCAO 模型大鼠达峰浓度（C_{max}）比正常大鼠略低［(2 834±768) ng/ml 对 (2 634±638) ng/ml］。在同一时间点，人参皂苷 CK 在 MCAO 模型大鼠血浆中比脑组织中分布更多；人参皂苷 CK 在正常大鼠体内吸收更快，血药浓度更高。**结论**　本研究建立的 LC-MS/MS 方法灵敏度高、重现性好、样品处理过程方便快速，适用于人参皂苷 CK 生物样品分析。模型大鼠人参皂苷 CK 脑血含量比很低，脑内分布较少，提示人参皂苷 CK 可能并非通过增加脑内物质基础的途径而产生神经保护作用。

关键词：人参皂苷 CK；液相色谱 - 质谱 / 质谱联用（LC-MS/MS）；大脑中动脉阻断（MCAO）；药物代谢动力学；神经保护作用
中图分类号：R-33　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-9188(2018)12-0813-08
DOI：10.13683/j.wph.2018.12.005

Development of an LC-MS/MS-based method for comparative study of pharmacokinetics of ginsenoside CK in normal rats and middle cerebral artery occlusion model rats

XU Shan[1,2], HU Duan-duan[1,2], CHEN Rui[1,2], XU Zhi-ru[1,2], LIU Li[1,2*]
(*1. State Key Laboratory of New Drug & Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437; 2. Shanghai Professional and Technical Service Center for Biological Material Druggability Evaluation, Shanghai 200437, China*)

Abstract: ***Objective*** To establish a high sensitive liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of ginsenoside CK in the rats with middle cerebral artery occlusion (MCAO), and to

收稿日期：2018-07-30；**修回日期：**2018-10-09
作者简介：许　杉，硕士研究生，专业方向：药物代谢动力学。
通信作者：刘　莉，博士，研究员，研究方向：从事药理、药物代谢动力学研究。
基金项目：上海市研发平台专项项目(18DZ2290900)。

study the pharmacokinetics parameters of ginsenoside CK in rats. ***Methods*** The plasma and brain tissue of rats were taken at different time points after single intragastric administration. Sample preparation was achieved by protein precipitation with methanol. Ginsenoside CK was detected by LC-MS/MS. The non-compartment model of DAS 2.0 software was used to calculate the pharmacokinetics parameters and the drug concentration in plasma and brain tissue in MCAO rats at different time points after administration. ***Results*** The method was linear over the range of 1~500 ng/ml with the lower limit of quantitation 1 ng/ml. The accuracy and precision of intra- and inter-day, recovery and stability of the method were all within the acceptable limits. Compared with the normal rats, the plasma $t_{1/2}$ of the MCAO model rats was longer [(2.5+1.1) h *vs* (11.0±10.9) h], and the AUC value was higher [(14 944+2 170) ng/ml·h *vs* (28 882+11 11 9) ng/ml·h]; the C_{max} of MCAO model rats was slightly lower [(2 834+768)ng/ml *vs* (2 634+638) ng/ml]. At the same time, the distribution of ginsenoside CK in the plasma of MCAO model rats was more than that in the brain tissue; the absorption of ginsenoside CK in normal rats was faster, and the blood concentration of ginsenoside CK was higher. ***Conclusion*** LC-MS/MS used for ginsenoside CK determination is a reliable approach. The low cerebral blood content of ginsenoside CK in MCAO model rats indicates that ginsenoside CK cannot penetrate the brain to effect.

Key words: ginsenoside CK; liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); middle cerebral artery occlusion (MCAO); pharmacokinetics; neuroprotective effect

人参是我国珍贵的传统中药，其主要活性成分是人参皂苷，其中，原人参二醇类人参皂苷主要包括人参皂苷 Rb1、Rb2、Rc、CK 等。而 CK 不是人参中天然存在的化合物，是口服原人参二醇如 Rb1、Rb2、Rc 等经肠道菌群的作用所产生的代谢产物[1-3]。目前已有文献报道，人参皂苷 CK 比起 Rb1 其抗结肠癌活性更强[4]，此外对于炎症[5]、癌症[6]、糖尿病[7]、免疫疾病[8]以及神经变性[9]等疾病治疗具有积极作用。

虽然人参皂苷 CK 以其突出的药理活性越来越受到人们的关注，但是对于其在脑神经保护、抗抑郁和抗焦虑作用方面的研究机制较少，其是否可以在大脑受损情况下在脑组织中分布更多，这方面的研究还未见报道，而这都将为治疗中枢神经系统疾病提供物质基础。此外，尽管人参皂苷 CK 具有如此多疗效，但由于目前对其的研究缺乏一种准确、高效的体内、外的定量方法，因此人参皂苷 CK 药物的开发受到限制。基于目前对人参皂苷 CK 方法的开发，同时为研究人参皂苷 CK 脑神经保护作用的机制，本试验拟构建大鼠大脑中动脉阻断（MCAO）模型，通过本试验所构建的液相色谱 - 质谱 / 质谱联用（LC-MS/MS）方法对人参皂苷 CK 进行检测，将人参皂苷 CK 在模型大鼠及正常大鼠体内的药物代谢动力学行为相比较，为以后研究人参皂苷 CK 用于治疗脑损伤疾病奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 大鼠，200 ～ 300 g，雌雄兼用，上海斯莱克实验动物有限公司提供，动物生产许可证号：SCXK（沪）2017-0005；动物使用许可证号：SYXK（沪）2014-0018；动物质量合格证号：2015000535018。

1.2 药品与仪器

人参皂苷 CK（上海标准品生物技术有限公司，生产批号：S0901，纯度：92%）；紫杉醇（上海医药工业研究院）；甲醇和乙腈为色谱纯（德国默克公司），其余试剂为分析纯，水为市售屈臣氏蒸馏水。

ACQUITY UPLC I-Class 型高效液相色谱仪和 Xevo TQ-S 型质谱仪（配有电喷雾离子源，包括 UNIFI 质谱工作站软件）（美国沃特世公司）；5415R 型冷冻高速离心机（德国艾本德公司）；MixMate 旋涡混合器（德国艾本德公司）；XP105DR 型电子天平（瑞士梅特勒 - 托利多公司）；研磨器（宁波新芝生物科技股份有限公司）。

1.3 方法

1.3.1 溶液配制

人参皂苷 CK 工作液的配制：精密称取人参皂苷 CK 标准品适量，用甲醇溶液溶解，再用甲醇配制成浓度为 1 mg/ml 的人参皂苷 CK 贮备液。用 90% 甲醇 / 水稀释人参皂苷 CK 贮备液，获得人参皂苷 CK 浓度分别为 10 000、5 000、2 000、1 000、200、100 及 20 ng/ml 标曲工作液溶液。用 90% 甲醇 / 水同法稀释人参皂苷 CK 贮备液，配成高、中、低浓度（8 000、1 600、40 ng/ml）的质量控制（QC）样品和最低定量下限（LLOQ，20 ng/ml）工作液。

内标溶液的配制：精密称取紫杉醇适量，用甲醇溶解，配成浓度为 1 mg/ml 的内标贮备液。精密吸取适量，用 90% 甲醇 / 水稀释得 200 ng/ml 的内标工作液。

1.3.2 血浆样品处理

精密吸取 50 μl SD 大鼠血浆样品于 1.5 ml 高速离心管中，加入 2.5 μl 内标工作液，再加入 150 μl 甲醇溶液进行蛋白沉淀，涡旋 30 s 混匀后，于 13 000 rpm 离心 10 min 后取上清液过滤置于进样瓶中进行 LC-MS/MS 分析。

1.3.3 脑组织样品处理

称取 100 mg 大鼠脑组织于 2 ml 离心管中，加入 5 μl 内标工作液，再加入 300 μl 甲醇溶液，然后加入钢珠，置于研磨器中研磨（45 Hz×30 s，两次匀浆），取出钢珠后，放于离心机离心（13 000 rpm×10 min），取上清过滤进样，进行 LC-MS/MS 分析。

1.3.4 构建大鼠 MCAO 模型

先将 SD 大鼠腹腔麻醉（麻醉剂：12% 水合氯醛；剂量：0.3 ml/100 g）。试验组：取颈部右侧旁正中切口，分离右侧颈外动脉（ECA）和颈内动脉（ICA），分离 ECA 主干，在其远端 1.5 cm 处结扎、切断。不打开颈动脉鞘，不分离和结扎翼腭动脉（PPA）。提拉 ECA 残端的结扎线，用微型血管夹在颈总动脉（CCA）分出 ECA 处，将 ECA 临时夹闭，在血管夹与 ECA 残端之间结扎一道缝合线，不打紧。使用导丝支持导管栓子，ECA 残端附近进线，扎紧缝合线，松开血管夹，推动尼龙线进入 ICA，进入距 ICA 和 ECA 分叉处约 1.8 ～ 1.9 cm 时，有阻挡感，表明栓线已越过大脑中动脉（MCA），到达大脑前动脉（ACA）的起始部。记录栓塞开始时间，将 ECA 上缝合线扎紧，用蘸有生理盐水的棉花盖住伤口。栓塞后 2 h，将尼龙线拔出 [10]。对照组：参照 Zea Longa 的线栓法制作模型 [11]。

1.3.5 色谱和质谱条件

1.3.5.1 色谱条件

色谱柱：ACQUITY UPLC BEH C18（50×2.1 mm，1.7 μm）；流速：0.3 ml/min；进样量：10 μl；柱温：40 ℃；流动相：乙腈 - 水，洗脱梯度见表 1。

表 1　人参皂苷 CK 洗脱梯度

Table 1　The elution gradient of ginsenoside CK

时间 /min	A：水 /%	B：乙腈 /%
0	85	15
0.2	85	15
2.8	5	95
3.0	5	95
3.1	85	15
4.5	85	15

1.3.5.2 质谱条件

离子源：电喷雾离子源（ESI），负离子模式；雾化气体温度：350 ℃；毛细管电压：3 kV；扫描方式：多反应监测（MRM）；待测物及内标的其他检测参数见表 2。

表 2　待测物及内标的质谱检测参数

Table 2　The mass transitions detected of ginsenoside CK and internal standard

化合物	母离子/Da (Q 1 Mass)	子离子/Da (Q 3 Mass)	锥孔电压/V (CV)	碰撞电压/eV (CE)
人参皂苷CK	645.41	202.95	10	30
紫杉醇	876.15	307.69	32	20

1.3.6 方法学验证

1.3.6.1 专属性

取大鼠空白血浆按“**1.3.2**”项下方法（内标工作液以 90% 甲醇 / 水代替）处理后，按照“**1.3.5** ”项下条件进行 LC-MS/MS 分析。另取大鼠空白血浆外加和给药后大鼠血浆样品按“**1.3.2**”和“**1.3.5**”项下过程处理后进样分析。

1.3.6.2 线性范围

取 SD 大鼠空白血浆和空白脑组织，分别加入系列浓度人参皂苷 CK 工作液，制得分别含人参皂苷 CK 1、5、10、50、100、250、500 ng/ml 的血样和脑组织，按“**1.3.2** 和 **1.3.3**”项下方法处理后进样分析。以人参皂苷 CK 与内标峰面积比值 R 为纵坐标，浓度 C 为横坐标，采用加权最小二乘法计算标准曲线，权重因子为 $1/C^2$，得到回归方程：血浆中：$R = 1.85\times10^{-3}C + 4.29\times10^{-4}$ ($r = 0.996\ 5$)，脑组织中：$R = 1.89\times10^{-2}C + 8.75\times10^{-4}$ ($r = 0.992\ 6$)。

1.3.6.3 精密度与准确度

取大鼠空白血浆，分别加入系列浓度人参皂苷 CK 工作液，制得分别含人参皂苷 CK 1 ng/ml 的 LLOQ 血样和 2、80 和 400 ng/ml QC 血样，每个浓度各 5 份，按“**1.3.2**”项下方法处理后进样分析，计算批内差。按上述方法连续测定 3 个分析批，计算批间差。其中，相对标准偏差 (RSD) ＝标准偏差 (SD)/ 计算结果的算术平均值 (X)×100%；准确度 (REC) ＝测定值 / 真实值 ×100%。

1.3.6.4 提取回收率

取大鼠空白血浆，分别加入系列浓度人参皂苷 CK 工作液，制得分别含人参皂苷 CK 2、80 和 400 ng/ml 的 QC 血样，每个浓度各 5 份，按“**1.3.2**”项下方法处理；另取大鼠空白血浆同法处理后的上清分别配制含人参皂苷 CK 2、80 和 400 ng/ml 的 QC 血样各 5 份，两者相同条件测定后做比较。

1.3.6.5 稳定性试验

取大鼠空白血浆，分别加入系列浓度人参皂苷 CK 工作液，配成分别含人参皂苷 CK 2 及 400 ng/ml 的 QC 血样，每个浓度各 5 份，处理后自动进样器 (10 ℃) 放置以下 3 种不同条件下 (10 ℃放置 24 h、反复冷冻 / 解融 3 次和 −40 ℃冻存 5 d)，考察样品稳定性。

1.3.6.6 基质效应

按“**1.3.2**”项下方法，处理 6 批来自不同个体的空白大鼠血浆，得到空白大鼠血浆基质后再加入低 (40 ng/ml)、高 (8 000 ng/ml) 2 个浓度的人参皂苷 CK 工作液，另用 90% 甲醇 / 水代替空白大鼠血浆同法处理，两者同时进样测定。对于每批基质，通过计算基质存在下的峰面积与不含基质的相应峰面积比值，计算人参皂苷 CK 和内标工作液的基质因子，然后通过人参皂苷 CK 的基质因子除以内标工作液的基质因子。

1.3.7 药物代谢动力学试验

1.3.7.1 正常大鼠灌胃给药与样品测定

正常 SD 大鼠 5 只，雌雄兼有，给药前禁食 12 h，自由饮水。分别灌胃给予 100 mg/kg 的人参皂苷 CK，给药后 0.083、0.25、0.5、1、1.5、2、3、6、9、12 及 24 h 眼眶采血约 100 μl，置于加有肝素抗凝的聚丙烯离心管中，8 000 rpm 低温 (4 ℃) 离心 6 min，定量取 50 μl 上清液于对应离心管中，置于 −40 ℃冰箱保存待测。血样按“**1.3.2**”项下方法处理后进样测定，分别计算血药浓度，使用 Graphpad Prism 6.0 绘制平均药 - 时曲线。

1.3.7.2 MCAO 模型大鼠灌胃给药与样品测定

正常雄性 SD 大鼠 21 只，分成 MCAO 取血组 ($n = 5$) 和 MCAO 取血取脑组 ($n = 16$)，给药前禁食 12 h，自由饮水，分别灌胃给予 100 mg/kg 的人参皂苷 CK 制剂。为试验效果更好，本试验采取给药 1 h 后再造模。MCAO 取血组，采血取样时间为 0.083、0.25、0.5、1、1.5、2、3、6、9、12 及 24 h，眼眶采血约 100 μl，置于加有肝素抗凝的聚丙烯离心管中，8 000 rpm 低温 (4 ℃) 离心 6 min，取 50 ul 上清液于对应离心管中，置于 −40 ℃冰箱保存待测。MCAO 取脑取血组，取样点为给药后的 2、3、6 和

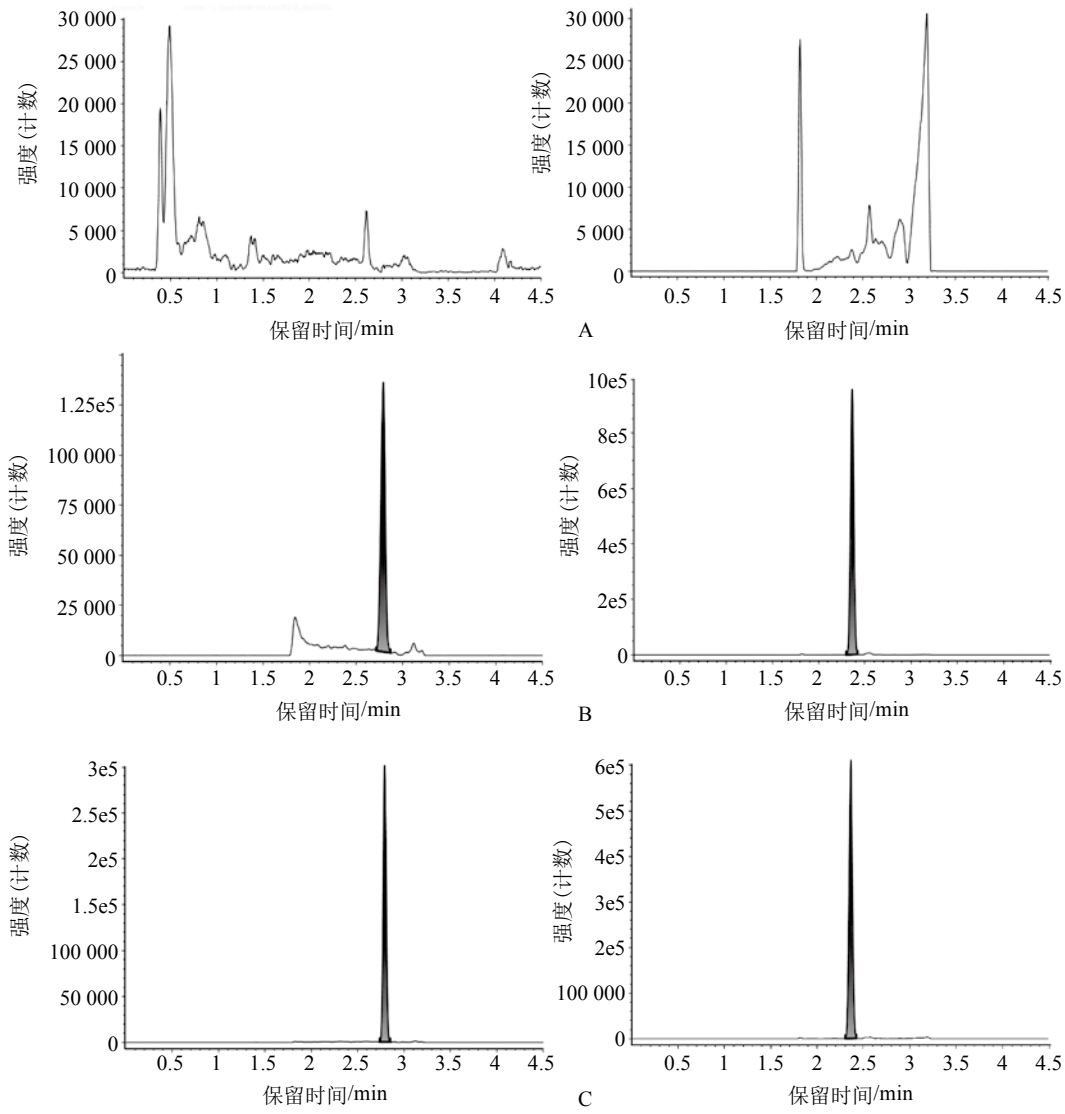
9 h，取血并取脑，每个时间段 4 只，血样处理同上，脑组织直接保存于 −40 ℃冰箱待测。血样按“**1.3.2**”项下方法处理后进样测定，分别计算血药浓度，使用 Graphpad Prism 6.0 绘制平均药 - 时曲线。

1.3.7.3　大鼠给药后的药物代谢动力学参数

采用 DAS 2.0 软件的非房室模型计算大鼠给药后的药物代谢动力学参数［零到 t 时间的血药浓度药 - 时曲线下面积（AUC_{0-t}）、零到无限大时间的血药浓度药 - 时曲线下面积（$AUC_{0-\infty}$）、零到无限大时间的平均滞留时间（$MRT_{0-\infty}$）、半衰期（$t_{1/2}$）、达峰时间（t_{max}）、经生物利用度校正的清除率（CL_z/F）、经生物利用度校正的表观分布容积（V_z/F）、达峰浓度（C_{max}）］。

1.3.7.4　MCAO 模型大鼠给药后在血浆及脑组织的药物分布

测量并计算 MCAO 模型大鼠给药人参皂苷 CK（100 mg/kg）后不同时间点（给药后 2、3、6、9 h）血浆及脑组织中浓度。



A：空白血浆；B：SD 大鼠给药后 1 h 血浆样品；C：空白血浆外加人参皂苷 CK 10 ng/ml

图 1　专属性考察色谱图

Figure 1　The HPLC chromatograms of ginsenoside CK and internal standard

2 结果

2.1 方法学验证

2.1.1 专属性

人参皂苷 CK 和内标的保留时间分别为 2.78 min 和 2.36 min，峰形较好，SD 大鼠血浆中内源性物质不干扰测定，色谱图见图 1。

2.1.2 线性范围

人参皂苷 CK 在 1 ～ 500 ng/ml 范围内线性关系良好， LLOQ 为 1 ng/ml。

2.1.3 精密度与准确度

表 3 显示，LLOQ、低、中和高 3 个浓度的批内回收率（REC）分别为 113.0%、114.1%、95.0%、102.0%，相对标准差（RSD）分别为 10.7%、4.7%、4.4%、10.7%；批间 REC 分别为 109.4%、113.4%、95.3%、100.3%，RSD 分别为 13.6%、10.1%、9.0%、10.6%。REC 均在 85% ～ 115% 范围内，RSD 均小于 15%，符合要求。

表 3 人参皂苷 CK 的大鼠血浆测定批内差和批间差

Table 3 Accuracy and precision of validation QC samples for ginsenoside CK in rat plasma

QC浓度/ng·ml^{-1}	批内差（n=5）			批间差（n=15）		
	$\bar{x}\pm s$/ng·ml^{-1}	REC/%	RSD/%	$\bar{x}\pm s$/ng·ml^{-1}	REC/%	RSD/%
1	1.13±0.12	113.0	10.7	1.09±0.15	109.4	13.6
2	2.28±0.11	114.1	4.7	2.27±0.23	113.4	10.1
80	76.30±3.35	95.0	4.4	76.28±6.87	95.3	9.0
400	407.60±0.43	102.0	10.7	401.40±42.48	100.3	10.6

2.1.4 提取 REC

结果表明，人参皂苷 CK 的提取 REC 在 70.5% ～ 80.6%，RSD ≤ 10.5%。

2.1.5 稳定性试验

表 4 显示，低和高浓度 QC 血样的 REC 均在 85.0% ～ 115.0% 范围内，RSD 均＜ 15.0%，说明样品在上述条件下均是稳定的。

2.1.6 基质效应

低和高 2 个浓度大鼠血样中人参皂苷 CK 经内标归一化的基质因子，分别为 79.0% 和 75.5%，不同来源血浆间的 RSD ≤ 15.0%。可忽略基质效应的影响。

表 4 不同条件下大鼠血浆中人参皂苷 CK 的稳定性（n = 5）

Table 4 Stabilities of ginsenoside CK in rats plasma under different conditions（n=5）

放置条件	QC浓度/ng·ml^{-1}			
	2		400	
	REC/%	RSD/%	REC/%	RSD/%
冷冻 / 解融 3 次	105.7	14.1	92.8	11.4
10 ℃放置 24 h	110.2	10.9	101.3	5.1
−40 ℃冻存 5 d	94.1	6.6	96.2	8.6

2.2 药物代谢动力学

2.2.1 大鼠灌胃给药与样品测定

图 2 和图 3 显示，与 MCAO 模型大鼠相比较，人参皂苷 CK 在正常大鼠体内吸收得更快，C_{max} 更高。MCAO 模型大鼠对人参皂苷 CK 的吸收较缓慢，在药物消除部分也较缓慢。

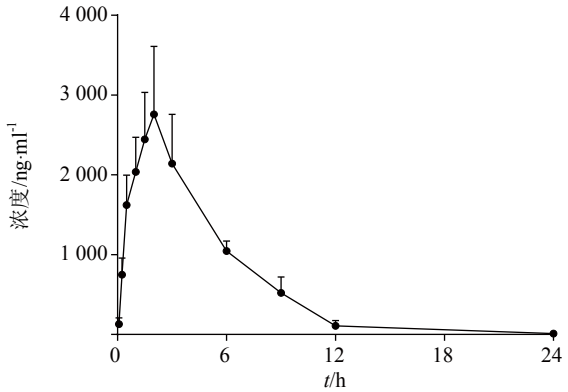


图 2 正常大鼠灌胃给药人参皂苷 CK 后平均药 - 时曲线（n = 5）

Figurea 2 Plasma concentration-time profile for after ginsenoside CK intragastric administration to nomal rats（n = 5）

2.2.2 大鼠给药后的药物代谢动力学参数

表 5 显示，与正常大鼠相比较，MCAO 模型大鼠血浆 $t_{1/2}$ 更长，AUC 值更大，因此 MCAO 模型大鼠的生物利用度更高，药物吸收高； MCAO 模型大鼠 C_{max} 值比正常大鼠略低，吸收速率相对较慢。

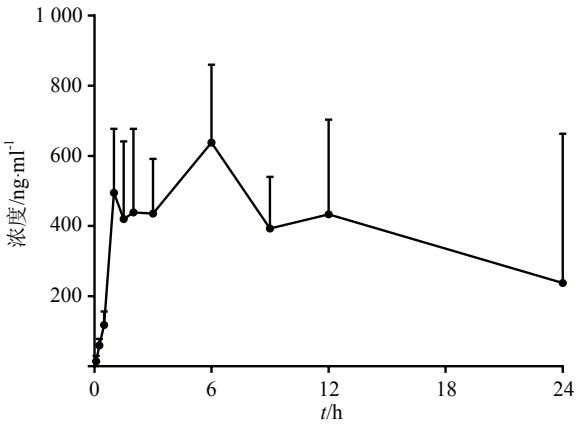


图 3　MCAO 模型大鼠灌胃给药人参皂苷 CK 后平均药 - 时曲线（n = 5）

Figure 3　Plasma concentration-time profile for after ginsenoside CK intragastric administration to MCAO rats（n = 5）

表 5　大鼠灌胃给药人参皂苷 CK 后药物代谢动力学参数（$\bar{x}\pm s$，n = 5）

Table 5　Pharmacokinetic parameters of ginsenoside CK after intragastrics administration（$\bar{x}\pm s$，n=5）

药动学参数	正常大鼠	MCAO 模型大鼠
$AUC_{0\text{-}t}$/μg·h·L^{-1}	14 944±2 170	28 882±11 119
$AUC_{0\text{-}\infty}$/ng·h·ml^{-1}	15 007±2 077	31 585±12 275
$MRT_{0\text{-}\infty}$/ng·h·ml^{-1}	4.5±0.6	8.2±0.9
$t_{1/2}$/h	2.5±1.1	11.0±10.9
t_{max}/h	2.1±0.5	5.4±4.3
CL_z/F/L·(kg·h)$^{-1}$	6.8±1.0	3.7±1.7
V_z/F/L·kg^{-1}	25.7±14.8	27.6±13.5
C_{max}/ng·ml^{-1}	2 834±768	2 634±638

2.2.3　MCAO 模型大鼠给药后血浆及脑组织的药物分布

MCAO 取脑取血组大鼠灌胃给药人参皂苷 CK（100 mg/kg）制剂后不同时间点的血浆及脑组织中样品浓度见表 6。

3　讨论

人参皂苷 CK 可能通过抑制小胶质细胞激活而具有抗炎和神经保护作用。本研究拟通过药物代谢动力学的方法研究人参皂苷 CK 抗炎及神经保护作用的机制。

表 6　MCAO 模型大鼠灌胃给药人参皂苷 CK 后不同时间点血浆及脑组织浓度（$\bar{x}\pm s$，n = 4，单位：ng/ml）

Table 6　The ginsenoside CK concentration in plasma and brain tissue at different time points of MCAO model rats after intragastric administration

（$\bar{x}\pm s$，n=4，unit: ng/ml）

给药后时间/h	MCAO 血浆	MCAO 脑组织
2	462.4±50.4	5.66±0.76
3	486.3±132.6	16.37±12.99
6	674.5±47.8	11.45±4.70
9	485.4±140.2	34.01±6.02

生物样品定量方法是一个项目开展的根本，关于人参皂苷 CK 生物样品测定方法有很多，主要有薄层扫描法[12]、高效液相色谱法[13]、液相色谱质谱串联法[14]、气相色谱法等[15]。但这些方法大多针对于能够同时检测多种人参皂苷，因此这些方法普遍都具有耗时长且灵敏度差的缺点。钟大放等[16]用甲基叔丁基醚提取人血浆中人参皂苷 CK 后采用液相色谱串联质谱的方法测定其锂加合离子，LLOQ 为 1 ng/ml。另有文献报道，在阳离子模式下监测人参皂苷 CK 钠加合离子通道测定人血浆及大鼠中人参皂苷的含量，其流动相中加入乙酸钠增加钠加合离子的稳定性，样品前处理同样采用液液提取的方法，该方法 LLOQ 为 1 ng/ml[17]。

本研究建立了一种快速、灵敏准确的 LC-MS/MS 方法测定人参皂苷 CK 生物样品。该方法不受内源性物质干扰，样品前处理简单，只需要蛋白沉淀一步操作。LLOQ 同样为 1 ng/ml，标准曲线线性符合要求（R^2 > 0.99），待测物日内和日间精密度基本符合 ±15% 之间。但本方法中人参皂苷 CK 离子化受基质影响较大，平均基质效应为 23%，在以后的研究过程中可通过液液提取或固相萃取的方式减少基质的影响，大大提高方法的灵敏度。

经过长时间的经验积累，本实验室在 MCAO 大鼠脑缺血模型构建的实际操作过程中，建模成功率达 90%。同时，对模型大鼠进行人参皂苷 CK 给药，并测定人参皂苷 CK 在 MCAO 模型大鼠体内的药物

代谢动力学及脑组织分布，并比较正常及模型大鼠体内的药物代谢动力学行为，也是本研究的创新之处。

Caco-2 细胞模型试验证实人参皂苷 CK 通过被动扩散的形式有中等程度的透膜能力，因此预测其生物利用度会随着给药剂量的增加而增加，20 mg/kg 灌胃给药后其绝对生物利用度可达 35%，平均 C_{max} 为 726 ng/ml，平均血浆 $t_{1/2}$ 为 220 min[18]。本文同样研究了人参皂苷 CK 大鼠灌胃给药 100 mg/kg 后体内药物代谢动力学行为。经药物代谢动力学软件 DAS2.0 拟合非房室模型药物代谢动力学参数，其平均 C_{max} 达到 2 834 ng/ml，平均血浆 $t_{1/2}$ 为 2.5 h，较文献报道在体内存留时间短。然而 MCAO 模型大鼠给药后人参皂苷 CK 血浆 $t_{1/2}$ 平均为 11.0 h，较正常大鼠体内存留时间明显延长，从而延长在体内的作用时间。然而本试验结果中 MCAO 模型大鼠脑组织分布并未有明显升高，脑血分布非常低，与人参皂苷 CK 在 MCAO 模型大鼠上有抗炎和神经保护作用似乎有所矛盾，并未增加脑内作用的物质基础。由于本研究中实验动物例数较少，MCAO 和正常大鼠部分药物代谢动力学参数不存在统计学差异，但本试验开发了一个高灵敏度测定人参皂苷 CK 的 LC-MS/MS 方法，在后期的研究中将增加实验动物例数以进一步研究人参皂苷 CK 在脑中的作用。有文献报道人参皂苷类 Rg1 在脑内没有直接抗炎效果，但在外周循环中可减轻下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴的限制，选择性钝化白细胞介素 -6 水平，并且在外周调节效果的同时伴随限制小胶质细胞活性，减轻促炎症调节因子、神经毒性因子在中枢部位的表达[19]。因此推测本研究中人参皂苷 CK 虽然在模型大鼠脑内分布未增加，但体内驻留时间明显延长，同样也是通过靶向外周免疫系统而达到治疗神经炎症诱导的神经精神紊乱。这一点将在后续的研究中继续探讨。

4 结论

本研究建立的 LC-MS/MS 方法灵敏度高、重现性好、样品处理过程方便快速，适用于人参皂苷 CK 生物样品分析。模型大鼠人参皂苷 CK 脑血含量比很低，脑内分布较少，提示人参皂苷 CK 可能并非通过增加脑内物质基础的途径而产生神经保护作用。

参考文献：

[1] Karikura M, Miyase T, Tanizawa H, *et al*. Studieson absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. Ⅶ. Comparison of the decomposition modes of ginsenoside-Rb_1 and -Rb_2 in the digestive tract of rats[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1991, 39(9): 2357-2361.

[2] Bae EA, Park SY, Kim DH. Constitutive β-gluccosidases hydrolyzing ginsenoside Rb_1 and Rb_2 from human intestinal bacteria[J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23(12): 1481-1485.

[3] Hasegawa H, Sung JH, Benno Y. Role of human intestinal Prevotella oris in hydrolyzing ginseng saponins[J]. Planta Med, 1997, 63(5): 436-440.

[4] Wang CZ, Du GJ, Zhang ZY, *et al*. Ginsenoside compound K, not Rb1, possesses potential chemopreventive activities in human colorectal cancer[J]. Int J Oncol, 2012, 40(6): 1970-1976.

[5] Hofseth LJ, Wargovich MJ. Inflammation, cancer, and targets of ginseng[J]. J Nutr, 2007, 137(1 Suppl): 183S-185S.

[6] Helms S. Cancer prevention and therapeutics: Panaxginseng, Altern[J]. Med Rev, 2004, 9(3): 259-274.

[7] Yuan HD, Kim JT, Kim SH, *et al*. Ginsengand diabetes: the evidences from *in vitro*, animal andhuman studies[J]. J Ginseng Res, 2012, 36(1): 27-39.

[8] Block KI, Mead MN. Immune system effects of echinacea, ginseng, and astragalus: a review[J]. Integr Cancer Ther, 2003, 2(3): 247-267.

[9] Kim HJ, Kim P, Shin CY, *et al*. A comprehensive review of the therapeutic and pharmacological effects of ginseng and ginsenosides in central nervous system[J]. J Ginseng Res, 2013, 37(1): 8-29.

[10] 吴浩, 吉训明, 赵喜庆. 改良大鼠 MCAO 模型的建立[J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(12): 1553-1554.

[11] Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[12] Kevers C, Jacques P, Gaspar T, *et al*. Comparative titration of ginsenosides by different techniques in commercial ginseng products and callus cultures[J]. J Chromatogr Sci, 2004, 42(10): 554-558.

（下转第 842 页）

参考文献：

[1] 宁晓东, 郑翠红, 李华萍. 社区高血压患者自我效能与治疗依从性相关性研究[J]. 大家健康(学术版), 2014, 11(12): 33-35.

[2] 王琛琛, 洪忻, 周海茸, 等. 南京市高血压病患者参加自我管理项目前后自我效能的改变情况及其影响因素[J]. 职业与健康, 2017, 33(17): 2380-2383.

[3] 王淑云. 社区高血压患者的自我管理与健康教育[J]. 医学信息, 2016, 29(23): 235-235.

[4] 郭东锋, 潘建清, 赵云鹏. 深圳市福田区社区高血压患者自我管理健康教育项目实施效果评价[C]. 深圳呼吸论坛, 2016.

[5] 刘焰雄, 陈锦辉, 徐瑜, 等. 福州某社区高血压病人自我管理健康教育需求评估[J]. 健康教育与健康促进, 2007, 12(1): 14-17.

[6] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南2010[J]. 中华高血压杂志, 2011, 19(8): 701-743.

[7] 姚娟丽. 健康管理在老年原发性高血压患者中的应用价值[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2016, 37(4): 486-487.

[8] 赵倩华. 原发性高血压患者降压药物使用管理分析[J]. 中国医药导刊, 2011, 13(11): 1963-1964.

[9] 李朝娥. 个性化护理干预对原发性高血压患者自我效能感及生存质量的影响[J]. 河南医学研究, 2017, 26(15): 133-135.

[10] 孙萍, 绳宇. 干预对社区原发性高血压患者自我效能感的影响[J]. 中国误诊学杂志, 2011, 11(35): 8583-8585.

[11] 许兴华. 原发性高血压病患者社区综合管理影响因素研究[D]. 东南大学, 2016.

[12] 张霞. 认知行为情志疗法在原发性高血压患者中的应用研究[D]. 河南大学, 2013.

[13] 卓志鹏, 袁雪丽, 陈忠伟, 等. 深圳市社区高血压自我管理小组效果分析[J]. 中国慢性病预防与控制, 2013, 21(6): 656-658.

[14] 王英. 社区高血压自我管理小组效果分析[J]. 中国社区医师, 2016, 32(9): 195-195.

[15] 韩占军, 郭春平. 社区健康自我管理小组在高血压管理中的效果分析[J]. 中国社区医师, 2015, 24(13): 146-147.

[16] 王雨敏, 刘铜龙. 社区老年高血压合并糖尿病患者实施健康小组形式加强自我管理效果分析[J]. 慢性病学杂志, 2017, 18(7): 764-765.

(责任编辑：赵绪韬)

(上接第 820 页)

[13] Zhou W, Li J, Li X, *et al*. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative determination of ginsenosides Rb1, Rd, F2, and compound K during the process of biotransformation of ginsenoside Rb1[J]. J Sep Sci, 2008, 31(6-7): 921-925.

[14] Paek IB, Moon Y, Kim J, *et al*. Pharmacokinetics of a ginseng saponin metabolite compound K in rats[J]. Biopharm Drug Dispos, 2006, 27(1): 39-45.

[15] Xu ZX, Xiao HB, Wang JN, *et al*. Analysis of ginsenosides by high performance liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry(LC/MS/MS)[J]. Se Pu, 2000, 18(6): 521-524.

[16] Chen YH, Lu YN, Yang Y, *et al*. Determination of ginsenoside compound K in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of lithium adducts[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2015, 5(5): 461-466.

[17] Choi ID, Ryu JH, Lee DE, *et al*. Enhanced absorption study of ginsenoside compound K (20-O-β-(D-glucopyranosyl)-20(S)-protopanaxadiol) after oral administration of fermented red ginseng extract(HYFRGTM) in healthy Korean volunteers and rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 10: 1-9.

[18] Paek IB, Moon Y, Kim J, *et al*. Pharmacokinetics of a ginsengsaponin metabolite compound K in rats, Biopharm[J]. Drug Dispos, 2006, 27(1): 39-45.

[19] Zheng X, Liang Y, Kang A, *et al*. Peripheral immuno-modulationg with ginsenoside Rg1 ameliorates neuroinflammationg-induced behavioral deficits in rats[J]. Neuroscience, 2014, 256(1): 210-222.

(责任编辑：赵绪韬)