

代谢分析

刺五加中 4 个木脂素成分的药代动力学及生物利用度研究*

张锦钰, 李艳翠, 孙长海**

(佳木斯大学药学院, 佳木斯 154007)

摘要 目的:建立超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)方法测定大鼠血浆中刺五加提取液中 7-羟基香豆素、秦皮素、异嗪皮啶、东莨菪内酯 4 个成分的含量,评价大鼠体内的药代动力学行为和生物利用度。**方法:**采用 Thermo Scientific Hypersil GOLD aQ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm),以 0.1% 甲酸-水(A)和 0.1% 甲酸-乙腈(B)(82:18)为流动相,流速 0.30 mL · min⁻¹,柱温 40 °C;质谱正离子模式扫描,进样量 5 μL;选取健康 SD 大鼠,单次灌胃 10 mL · kg⁻¹(相当于原药 1 g · kg⁻¹剂量)的刺五加提取液,测定给药后不同时间间隔的待测物质血浆浓度,利用 DAS 软件,经非房室模型拟合计算药代动力学参数。**结果:**7-羟基香豆素($r=0.9994$)、秦皮素($r=0.9989$)、异嗪皮啶($r=0.9993$)、东莨菪内酯($r=0.9984$)质量浓度在 0.05~55 μg · mL⁻¹范围内线性关系良好,精密度 RSD 均 < 15%,回收率均在 85%~115%。绝对生物利用度均在 59%~78%,相对生物利用度均在 80%~87%。提取回收率、基质效应和稳定性均满足相关要求。**结论:**大鼠单次灌胃刺五加提取液后,4 个待测物质均被大鼠吸收和消除,方法验证结果符合生物样本分析方法指导原则,可用于评价刺五加提取液在大鼠体内的药代动力学行为和生物利用度。

关键词:刺五加;药物代谢动力学;生物利用度;7-羟基香豆素;秦皮素;异嗪皮啶;东莨菪内酯;统计矩量法;超高效液相色谱-串联质谱

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)05-0841-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.05.12

Study on pharmacokinetics and bioavailability of four lignans in *Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma Seu Caulis**

ZHANG Jin-yu, LI Yan-cui, SUN Chang-hai**

(College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

Abstract Objective: To establish a ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrum in series method for the quantification of 7-hydroxycoumarin, fraxetin, isofraxidin and scopoletin in the aqueous extract of *Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma Seu Caulis* in rat plasma, and to evaluate the pharmacokinetic behavior and bioavailability in rats. **Methods:** The chromatography was performed on Thermo Scientific Hypersil GOLD aQ (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm) column with 0.1% aqueous formic acid-0.1% acetonitrile formic acid solution (82:18) as the mobile phase at the flow rate of 0.30 mL · min⁻¹, and column temperature of 40 °C. Mass spectrometry positive ion mode scan was used, and sample size was 5 μL. Healthy SD rats were selected for a single

* 黑龙江省佳木斯大学北药与功能食品(JDXKTD-2019005)

** 通信作者 Tel:(0454)15904544250;E-mail:sch-jms@sohu.com

第一作者 Tel:(0454)15765369662;E-mail:979466584@qq.com

gavage of $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ of *Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma Seu Caulis* water extract (equivalent to the dose of $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ of the original drug). Plasma concentration of the substances was determined at different time intervals after administration, and the pharmacokinetic parameters were calculated using DAS software by non - at-rioventricular model fitting. **Results:** The methodological results showed that 7 - hydroxycoumarin ($r=0.9994$), fraxetin ($r=0.9989$), isofraxidin ($r=0.9993$) and scopoletin ($r=0.9984$) had good linearity in the range of $0.05 - 55 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and RSDs of precision of the four substances were all less than 15%. The recovery was 85% - 115%. The absolute bioavailability ranged from 59% to 78%, and the relative bioavailability ranged from 80% to 87%. The extraction recovery, matrix effect and stability met the relevant requirements.

Conclusions: After a single gavage of the aqueous extract of *Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma Seu Caulis* in rats, the four substances to be tested are absorbed and eliminated by rats. The method validation results are in line with the guiding principles of biological sample analysis methods, and can be applied to evaluate the pharmacokinetic behavior and bioavailability of the aqueous extract of *Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma Seu Caulis* in rats.

Keywords: *Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma Seu Caulis*; pharmacokinetics; bioavailability; 7 - hydroxycoumarin; fraxetin; isofraxidin; scopoletin; statistical method of moments; UPLC - MS/MS

刺五加为五加科植物刺五加 [*Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms] 的干燥根和根茎或茎,生长地区广泛^[1-3]。临床证明,刺五加具有扩张人体大脑血管^[4],镇静安神^[5],增强机体抗疲劳能力^[6],降低血小板凝集^[7-9],促进蛋白质合成,降低组织耗氧量,扩张血管从而降低脑血栓形成等作用^[10],可用于冠心病、脑梗死及脑梗死后抑郁、老年功能性失眠和更年期综合征等疾病的治疗^[11]。

实验表明,刺五加的上百个成分中,至少有 40 个成分可以被吸收,有着广阔的研究前景。但目前对刺五加的研究主要集中在刺五加苷 E、紫丁香苷、金丝桃苷、绿原酸的大鼠体内药代动力学^[12],对于其他化学成分研究较少,例如具有抗肿瘤、降血压等药理作用的木脂素类化合物的药代动力学研究,至今还未有相关报道^[13-15]。本文对刺五加中 7 - 羟基香豆素、秦皮素、异嗪皮啶、东莨菪内酯 4 个木脂素成分的药代动力学及生物利用度进行研究,以期为后续刺五加的临床使用提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Dionex Ultimate 3000 RSLC 高效液相色谱仪、Thermo Scientific Q Exactive Series 质谱仪, Thermo Fisher Scientific 公司; TGL - 16G 台式离心机,无锡莱浦仪器设备有限公司; HESI - II 型离子源, Thermo Fisher Scientific 公司; KQ - 250 型医用数控超声波清

洗机,昆山超声仪器有限公司; Sartorius BP211D 十分之一电子分析天平,赛多利斯股份有限公司; FW100 高速粉碎机,天津泰斯特公司; Master Touch - S 15 超纯水系统,上海 HHitech 公司。

1.2 试药

甲醇、甲酸、乙腈 (Thermo Fisher Scientific 公司),水为实验制超纯水。对照品秦皮素 (批号 MUST - 20103019,纯度 $\geq 99\%$)、异嗪皮啶 (批号 MUST - 19041707,纯度 $\geq 98\%$)、东莨菪内酯 (批号 MUST - 21032415,纯度 $\geq 99\%$)、7 - 羟基香豆素 (批号 DSTDQ006601,纯度 $\geq 98\%$),均购自中国食品药品检定研究院;牡荆素对照品 (内标,批号 20121112,纯度 $\geq 99\%$),购自天津一方科技有限公司。刺五加根茎采自佳木斯市四丰山野生植物区,经佳木斯大学药学院宗希明高级实验员鉴定。刺五加注射液来自佳木斯市多多药业有限公司,对应化合物质量浓度为 7 - 羟基香豆素 $0.1882 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,秦皮素 $0.3213 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,异嗪皮啶 $0.6938 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,东莨菪内酯 $0.3162 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

SPF 级雄性 SD 大鼠 6 只,体质量 $180 \sim 220 \text{ g}$,长春市亿斯实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK (吉) - 2021 - 0002。

2 方法与结果

2.1 刺五加提取液的制备

采集刺五加样品,置于烘箱中, $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 下干燥 1 h,

粉碎后过 80 目筛,随后在 80 °C 的烘箱中烘烤 2 h,干燥至恒重。将所得样品以料液比 1:10 的比例加入超纯水,置于锥形瓶中浸泡 12 h,40 °C 条件下超声(650 W,40 kHz)提取 2 h,提取液置于 1.5 mL 离心管中,3 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清液,即得(对应化合物质量浓度为 7-羟基香豆素 0.146 8 mg·mL⁻¹,秦皮素 0.251 2 mg·mL⁻¹,异嗪皮啉 0.542 4 mg·mL⁻¹,东莨菪内酯 0.246 7 mg·mL⁻¹)。

2.2 动物分组与给药

6 只大鼠适应性喂养 14 d,试验前禁食不禁水 12 h,按照 10 mL·kg⁻¹ 给药刺五加提取液(相当于给药剂量为 7-羟基香豆素 0.293 6 mg·kg⁻¹,秦皮素 0.502 4 mg·kg⁻¹,异嗪皮啉 1.084 8 mg·kg⁻¹,东莨菪内酯 0.493 4 mg·kg⁻¹)和刺五加注射液(相当于给药剂量为 7-羟基香豆素 0.376 3 mg·kg⁻¹,秦皮素 0.642 6 mg·kg⁻¹,异嗪皮啉 1.387 5 mg·kg⁻¹,东莨菪内酯 0.632 3 mg·kg⁻¹),分别于给药后 5、15、30、45、60、90、120、180、240、360、480、600、720、1 440 min 眼眶取血约 0.5 mL,将全血置于肝素钠管中,低温离心(4 °C,3 000 r·min⁻¹,15 min),取上清,即得血浆样品,于 -80 °C 保存待测。

2.3 混合对照品溶液的制备

精密称取对照品 7-羟基香豆素 10.25 mg、秦皮素 11.10 mg、异嗪皮啉 10.25 mg、东莨菪内酯 10.55 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,得混合对照品储备液,用甲醇稀释至不同浓度(7-羟基香豆素 0.05、1、2.5、5、10、25、51.25 μg·mL⁻¹,秦皮素 0.05、1、2.5、5、10、25、55.50 μg·mL⁻¹,异嗪皮啉 0.05、1、2.5、5、10、25、51.25 μg·mL⁻¹,东莨菪内酯 0.05、1、2.5、5、10、25、52.75 μg·mL⁻¹),即得。

精密称取牡荆素对照品 2.00 mg,用甲醇配制质量浓度为 20 μg·mL⁻¹的内标溶液。

2.4 对照品血浆的制备及处理

精密吸取空白大鼠血浆 100 μL,置 1.5 mL EP 管中,加入不同浓度混合对照品溶液 10 μL 及内标溶液 10 μL,混匀,加甲醇 380 μL,涡旋 30 s,静置 30 min,离心(4 °C,13 000 r·min⁻¹,15 min),取上清过 0.22 μm 微孔滤膜,置进样瓶中,待测。

2.5 血浆样品处理

取大鼠血浆 100 μL,置 1.5 mL EP 管中,加入内标溶液 10 μL,混匀,加入甲醇 390 μL,按照“2.4”项

方法操作,即得。

2.6 UPLC-MS 测试条件

高分辨质量光谱参数:鞘气压力为 0.206 8 MPa,辅助气体压力为 0.068 9 MPa,吹扫气压力为 0 MPa;毛细管电压正离子模式为 3.5 kV,负离子模式为 3.2 kV;离子传输管温度为 320 °C;AUX 气体加热温度为 350 °C;碰撞气体为高纯氮气(99.999 9%);归一化碰撞能量为 10、40、70 eV;s-lens 透镜振幅为 60.0;扫描模式:平行监测扫描触发二级质谱扫描,监测离子扫描质量锁定为 m/z 163.039 08、 m/z 209.044 51、 m/z 223.060 15、 m/z 193.049 18、 m/z 433.112 88。特异性丢失扫描质量锁定为 m/z 135.044 14、 m/z 194.020 78、 m/z 255.029 69、 m/z 178.025 82。分子量特异性丢失误差范围设置为 500×10^{-6} (parts per million)。一级质谱分辨率为 70 000 FWHM,二级质谱分辨率为 17 500 FWHM;离子扫描范围为 m/z 50~1 500;微扫描次数为 3 次;四级隔离窗为 m/z 1.5;动态排除时间为 5 s。

色谱条件:采用 Thermo Scientific Hypersil GOLD aQ 色谱柱(100 min×2.1 mm,1.9 μm),流动相为 0.1% 甲酸-水(A)和 0.1% 甲酸-乙腈(B),等度洗脱(0~8 min,82:18),流速 0.30 mL·min⁻¹,柱温 40 °C,进样量 5 μL。

2.7 体内分析方法的建立

2.7.1 稳定性考察 将血浆样品在 4 °C 下放置 0、2、4、6、8、10、12、24 h 后分别进样,考察静置稳定性,结果见表 1,目标成分峰面积的 RSD 均 < 6%,表明血浆样品在 24 h 内稳定性良好。将血浆样品置于 -80 °C 下冻融循环 3 次,分别进样,考察冻融稳定性,结果目标成分峰面积的 RSD 均 < 8%,表明血浆样品冻融稳定性良好。

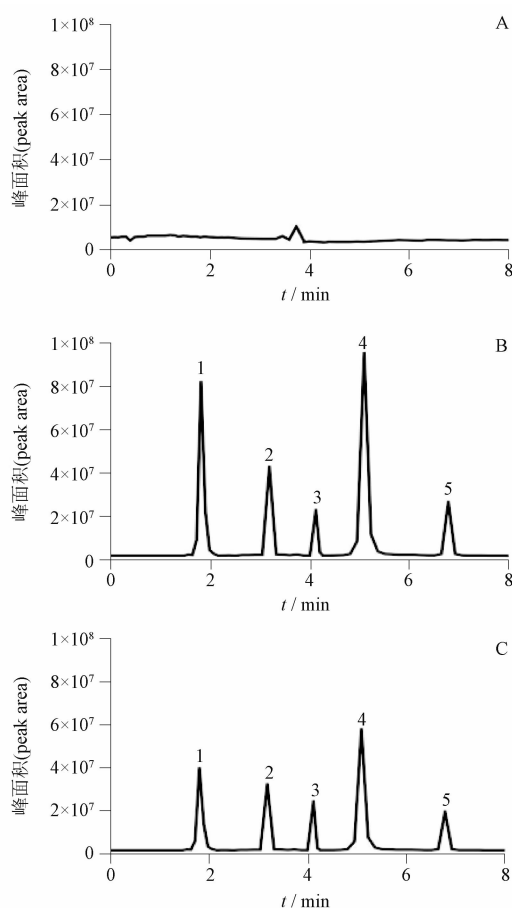
2.7.2 专属性考察 对大鼠空白血浆、对照品血浆、血浆样品分别进样分析,检验方法专属性,结果见图 1。除目标组分外,无其他杂峰及假阳性离子峰的干扰,说明该方法能够准确检测目标成分且无干扰,检测专属性良好。

2.7.3 基质效应考察 取大鼠空白血浆 100 μL,按照“2.4”项方法操作,配制成低、中、高 3 个浓度(7-羟基香豆素 0.05、5、51.25 μg·mL⁻¹,秦皮素 0.05、5、55.50 μg·mL⁻¹,异嗪皮啉 0.05、5、51.25 μg·mL⁻¹,东莨菪内酯 0.05、5、52.75 μg·mL⁻¹)的质控溶液,作为基质溶液。将 10 μL 对照品溶液

表 1 稳定性结果

Tab. 1 Stability results

成分 (component)	静置稳定性 (static stability)		冻融稳定性 (freezing and melting stability)	
	mean \pm SD	RSD/%	mean \pm SD	RSD/%
7-羟基香豆素(7-hydroxycoumarin)	2 449 511 \pm 81 814	3.3	2 521 586 \pm 130 214	5.2
秦皮素(fraxetin)	2 264 221 \pm 78 795	3.5	2 341 584 \pm 115 682	4.9
异嗪皮啶(isofraxidin)	2 311 022 \pm 93 596	4.1	2 332 574 \pm 159 875	6.9
东莨菪内酯(scopoletin)	1 107 610 \pm 54 162	4.9	1 102 548 \pm 70 215	6.4



1. 7-羟基香豆素(7-hydroxycoumarin) 2. 秦皮素(fraxetin) 3. 牡荆素(isofraxidin) 4. 异嗪皮啶(isofraxidin) 5. 东莨菪内酯(scopoletin)

图 1 空白血浆(A)、对照品血浆(B)、血浆样品(C) UPLC-ESI-Q-Orbitrap ion chromatograms of blank plasma (A), plasma mixed reference substance (B), plasma sample (C)

Fig. 1 UPLC-ESI-Q-Orbitrap ion chromatograms of blank plasma (A), plasma mixed reference substance (B), plasma sample (C)

(低、中、高)与 10 μ L 内标溶液、480 μ L 甲醇混匀,作为无基质溶液,每份溶液平行测定 6 次,根据峰面积计算 RSD。以基质溶液与无基质溶液响应值的比值检验基质效应,结果(表 2)基质效应均在 96.6%~102.4%,表明基质效应对实验结果的影响

较小,符合试验要求;平行测定 6 次峰面积的 RSD 均 < 3%,表明试验数据可靠。

2.7.4 精密度试验 对低、中、高 3 个浓度溶液分别测定 6 次,根据峰面积计算批内精密度;对低、中、高 3 个浓度溶液平行配制 5 份溶液进样分析,根据峰面积计算批间精密度。结果见表 3、4,精密度 RSD 均 < 6%,表明方法精密度良好。

2.7.5 线性关系考察 对样品用内标法进行定量检测。以药物浓度 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标,样品与内标的峰面积比值 Y 为纵坐标,进行加权线性回归。以绝对进样量 3 倍于信噪比的比值为检测限,绝对进样量 10 倍于信噪比的比值为定量限,结果见表 5。 r 均 > 0.997,表明回归方程相关性良好,定量限 RSD 均 < 5%。

2.7.6 回收率试验 对血浆样品加入已知浓度的对照品溶液进样分析,计算回收率,结果见表 6,回收率均在 88%~109%,表明方法准确度良好。

2.8 药代动力学及生物利用度研究

2.8.1 药代动力学参数结果 以统计矩方法计算药动学参数,结果见表 7。刺五加提取液 ig 药时曲线图见图 2。

2.8.2 个体差异结果 采用 SPSS 软件对 6 只大鼠血浆样品数据进行独立个体差异性分析,以大鼠编号为分组变量,总离子流图相对丰度为检验变量,设置置信区间百分比为 95%,每组数据与其他组数据单循环检验后取均值, P 均 > 0.05,表明独立样本之间没有显著性差异。对每只大鼠的血浆样品与总样品均值进行单样本差异性检验,设置置信区间百分比为 95%, P 均 > 0.05,表明单样本与总样本量均值没有显著性差异,表 8 列出了个体差异性详细结果,表明大鼠之间的个体性差异在实验可接受范围内,研究数据有效,可用于后续研究参考。

表 2 基质效应结果 (n = 6)
Tab. 2 Results of matrix effects

成分 (component)	低浓度 (low concentration)		中浓度 (medium concentration)		高浓度 (high concentration)	
	基质效应 (matrix effect)/%	RSD/%	基质效应 (matrix effect)/%	RSD/%	基质效应 (matrix effect)/%	RSD/%
7-羟基香豆素 (7-hydroxycoumarin)	99.1	1.6	98.6	0.92	102.5	1.9
秦皮素 (fraxetin)	98.3	1.4	97.9	1.9	101.3	1.99
异嗪皮啶 (isofraxidin)	98.2	1.1	102.3	1.4	99.1	1.4
东莨菪内酯 (scopoletin)	97.9	1.6	99.5	1.2	101.2	2.0

表 3 批内精密度结果 (n = 6)
Tab. 3 Results of in-batch precision

成分 (component)	低浓度 (low concentration)		中浓度 (medium concentration)		高浓度 (high concentration)	
	峰面积 (peak area)	RSD/ %	峰面积 (peak area)	RSD/ %	峰面积 (peak area)	RSD/ %
7-羟基香豆素 (7-hydroxycoumarin)	15 563 ± 896	5.8	30 573 791 ± 1 002 820	3.3	315 949 990 ± 12 006 070	3.8
秦皮素 (fraxetin)	46 995 ± 2 481	5.3	6 230 974 ± 214 346	3.4	70 542 675 ± 1 664 807	2.4
异嗪皮啶 (isofraxidin)	11 169 ± 631	5.7	1 841 688 ± 55 435	3.0	14 494 448 ± 478 317	3.3
东莨菪内酯 (scopoletin)	39 015 ± 1 767	4.5	6 346 375 ± 152 948	2.4	70 416 652 ± 1 654 791	2.4

表 4 批间精密度结果 (n = 6)
Tab. 4 Inter-lot precision results

成分 (component)	低浓度 (low concentration)		中浓度 (medium concentration)		高浓度 (high concentration)	
	峰面积 (peak area)	RSD/ %	峰面积 (peak area)	RSD/ %	峰面积 (peak area)	RSD/ %
7-羟基香豆素 (7-hydroxycoumarin)	15 108 ± 796	5.3	31 258 671 ± 1 012 587	3.2	312 357 848 ± 11 898 545	3.8
秦皮素 (fraxetin)	43 525 ± 2 245	5.2	6 055 874 ± 223 484	3.7	71 200 548 ± 1 598 742	2.2
异嗪皮啶 (isofraxidin)	10 859 ± 611	5.6	1 359 888 ± 53 248	3.9	12 345 865 ± 487 125	3.9
东莨菪内酯 (scopoletin)	37 585 ± 1 358	3.6	6 235 789 ± 151 238	2.4	71 204 489 ± 1 531 587	2.2

表 5 线性关系结果
Tab. 5 Results of linear relation

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range)/(μg · mL ⁻¹)	LOD/ ng	LOQ/ ng	RSD/ %
7-羟基香豆素 (7-hydroxycoumarin)	Y = 0.029 1X - 0.162 5	0.999 4	0.050 00 ~ 51.25	0.198 0	0.660 2	2.8
秦皮素 (fraxetin)	Y = 0.006 5X - 0.061 3	0.998 9	0.054 10 ~ 55.50	0.333 0	1.110	3.3
异嗪皮啶 (isofraxidin)	Y = 0.001 3X + 0.022 2	0.999 3	0.050 00 ~ 51.25	0.486 0	1.620	2.5
东莨菪内酯 (scopoletin)	Y = 0.006 5X - 0.074 2	0.998 4	0.051 50 ~ 52.75	0.693 0	2.310	2.7

2.8.3 绝对和相对生物利用度 根据刺五加提取液 ig 血药浓度 - 时间曲线图, 计算血管外 AUC; 根据刺五加提取液 iv (给药剂量为 7-羟基香豆素 0.293 6 mg · kg⁻¹、秦皮素 0.502 4 mg · kg⁻¹、异嗪皮啶 1.084 8 mg · kg⁻¹、东莨菪内酯 0.493 4 mg · kg⁻¹),

计算血管内 AUC。根据刺五加提取液 ig 血药浓度 - 时间曲线图, 计算试验制剂 AUC; 根据刺五加注注射液 ig 血药浓度 - 时间曲线图, 计算参比制剂 AUC。通过个体差异检验后每组实验结果取均值, 详细结果见表 9, 生物利用度结果见表 10。

表 6 回收率结果 ($n=6$)
Tab. 6 Results of recovery rate

成分 (component)	本底量 (the background quantity)/ μg	加入量 (added)/ μg	实测值 (measured value)/ μg mean \pm SD	回收率 (recovery)/%	RSD/ %
7-羟基香豆素(7-hydroxycoumarin)	8.44	6.752	15.52 \pm 0.21	104.8	1.4
		8.44	16.61 \pm 0.25	96.8	1.5
		10.13	19.12 \pm 0.24	105.4	1.2
秦皮素(fraxetin)	5.260	4.208	9.11 \pm 0.09	91.4	0.97
		5.26	10.23 \pm 0.09	94.4	0.85
		6.312	11.49 \pm 0.13	98.7	1.2
异嗪皮啉(isofraxidin)	21.87	17.5	37.46 \pm 0.51	89.1	1.4
		21.87	42.78 \pm 0.51	95.6	1.2
		26.24	48.66 \pm 0.51	102.1	1.0
东莨菪内酯(scopoletin)	2.570	2.056	4.490 \pm 0.04	93.2	0.94
		2.57	5.230 \pm 0.08	103.6	1.4
		3.084	5.830 \pm 0.08	105.8	1.4

表 7 药代动力学参数结果
Tab. 7 Results of pharmacokinetic parameters

成分 (component)	$AUC_{(0-t)}$ / ($\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$)	$AUC_{(0-\infty)}$ / ($\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$)	T_{max} /h	C_{max} / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$t_{1/2}$ /h	(CL/F) / ($\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$)	$(\text{V1}/F)$ / ($\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$)
7-羟基香豆素(7-hydroxycoumarin)	17.05 \pm 0.23	17.05 \pm 0.14	0.500 \pm 0.01	10.02 \pm 0.14	1.801 \pm 0.03	0.110 \pm 0.00	0.287 \pm 0.01
秦皮素(fraxetin)	43.92 \pm 0.65	50.58 \pm 0.58	1.500 \pm 0.01	4.882 \pm 0.06	7.801 \pm 0.11	0.063 \pm 0.00	0.714 \pm 0.02
异嗪皮啉(isofraxidin)	26.86 \pm 0.33	26.90 \pm 0.37	2.000 \pm 0.03	5.757 \pm 0.06	2.583 \pm 0.03	0.259 \pm 0.01	0.967 \pm 0.02
东莨菪内酯(scopoletin)	54.21 \pm 0.53	57.43 \pm 0.68	1.000 \pm 0.01	11.61 \pm 0.11	6.140 \pm 0.05	0.055 \pm 0.00	0.488 \pm 0.01

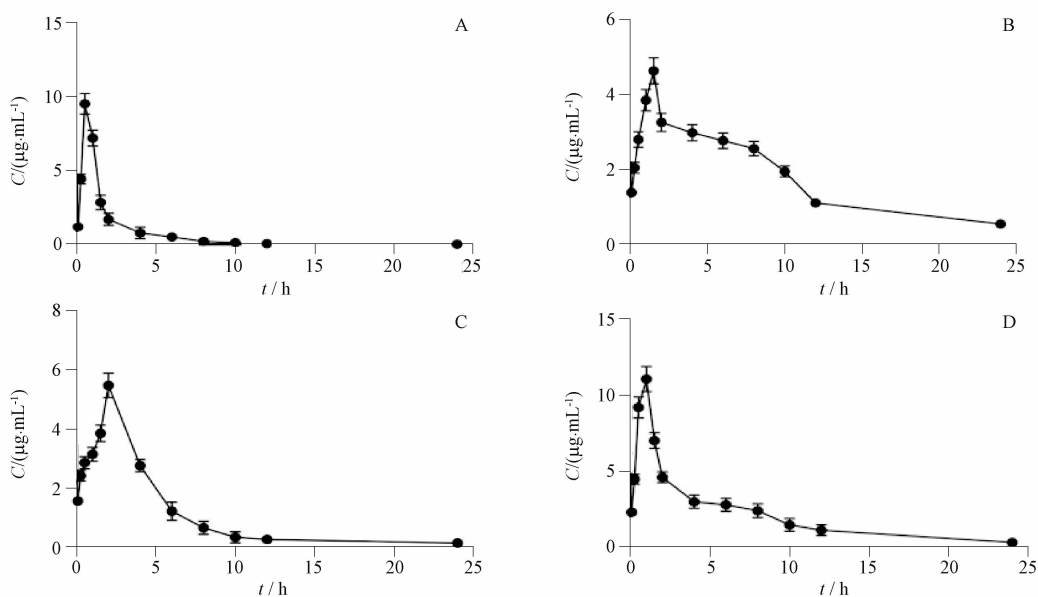


图 2 刺五加提取液 ig 7-羟基香豆素(A)、秦皮素(B)、异嗪皮啉(C)、东莨菪内酯(D)的药时曲线图

Fig. 2 The drug time curves of *Acanthopanax Senticosus Radix et Rhizoma Seu Caulis* extract ig 7-hydroxycoumarin (A), fraxetin (B), isofraxidin (C), and scopoletin (D)

表 8 个体差异性结果 ($n=6$)

Tab. 8 Results of individual differences

大鼠编号 (rat number)	P	
	独立样本结果 (independent sample result)	单样本结果 (independent sample result)
1	0.33	0.25
2	0.28	0.35
3	0.34	0.21
4	0.24	0.39
5	0.31	0.21
6	0.18	0.22

2.9 质谱裂解研究结果

经 Xcalibur 软件处理,在刺五加提取液和大鼠血浆的 MS 图中均发现 m/z 163.039 08 的准分子离子峰,设定正负扫描模式质量校正误差范围为 5×10^{-6} ,根据软件分析,在 $[M+H]$ 模式下锁定 1 种加和离子化学式,在 m/z 163.039 08 的 MS² 光谱图下显示了 1 个信号强度为 4×10^7 的 m/z 163.039 08 的前体离子,校正误差为 -0.671×10^{-6} ,质谱图结果显示,前体离子在 20 能量下丢失羰基基团,在更高的能量下逐渐丢失 16、12、12 的碎片,这与 7-羟基香豆素的苯环开裂丢失 CO,在最优能量 55 的碰撞

表 9 AUC ($\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$) 结果

Tab. 9 Results of AUC

成分 (component)	提取液 ig 组 (extract ig group)	提取液 iv 组 (extract iv group)	注射液 ig 组 (injection ig group)
7-羟基香豆素(7-hydroxycoumarin)	19.24 ± 0.43	30.26 ± 0.56	22.64 ± 0.34
秦皮素(fraxetin)	42.81 ± 0.51	55.41 ± 1.37	50.89 ± 0.71
异嗪皮啶(isofraxidin)	26.73 ± 0.40	40.26 ± 0.55	31.57 ± 0.55
东莨菪内酯(scopoletin)	54.21 ± 1.27	69.80 ± 1.29	65.42 ± 1.04

表 10 生物利用度结果

Tab. 10 Results of bioavailability

成分 (component)	相对生物利用度 (relative bioavailability)/ %	绝对生物利用度 (absolute bioavailability)/ %
	7-羟基香豆素(7-hydroxycoumarin)	84.9
秦皮素(fraxetin)	84.1	77.26
异嗪皮啶(isofraxidin)	84.6	66.39
东莨菪内酯(scopoletin)	82.8	77.66

下,与苯环逐渐丢失 O、C、C 原子的相对分子质量吻合,初步鉴定该化合物为 7-羟基香豆素。

结合 mzVault 和 Thermo Scientific OTCML 本地数据库,给出该化合物匹配分数为 93.3,数据库的二级光谱图下在 m/z 135.044 05、119.049 35、107.049 48 处出现了与实验数据相同的特征碎片峰,文献报道该化合物计算化学参数中的不饱和度为 6.5,与软件计算结果一致,经与 mzCloud 光谱数据库比对,匹配率高达 90.5%,确定该化合物为 7-羟基香豆素,裂解途径见图 3。

经 Xcalibur 软件处理,发现在刺五加提取液和大鼠血浆的 MS 图中均出现 m/z 209.044 51 的准分子离子峰,设定正负模式质量校正误差范围为 5×10^{-6} ,根据软件分析,在 $[M+H]$ 模式下锁定 1 种加和离子化学式,在 m/z 209.044 51 的 MS² 光谱图下显示了 1 个信号强度为 3×10^6 的 m/z 209.044 51 的前体离子,校正误差为 0.288×10^{-6} ,后续在低能量下观察到碎片信息为 m/z 194.020 78、149.023 21、121.028 48,此结构经过与数据库比对分析,为陆续丢失甲基基团、羧基基团、羰基基团形成;在高能量下观察到 m/z 181.049 32、163.038 71、135.043 98、107.049 40 的碎片,该碎片形成为丢失羰基基团、水分子、接着苯环连续断裂丢失 2 个羰基基团,最终形成苯甲醛结构,为苯环的氢被醛基取代后的化合物,此裂解规律符合秦皮素质谱数据,因此初步鉴定该化合物为秦皮素。

结合 mzVault 和 Thermo Scientific OTCML 本地数据库,给出该化合物匹配分数为 91.8,数据库的二级光谱图下,在 m/z 194.020 78、163.038 71、149.023 21、135.043 98、107.049 40 处出现了与实验数据相同的特征碎片峰,文献报道该化合物计算化学参数中的

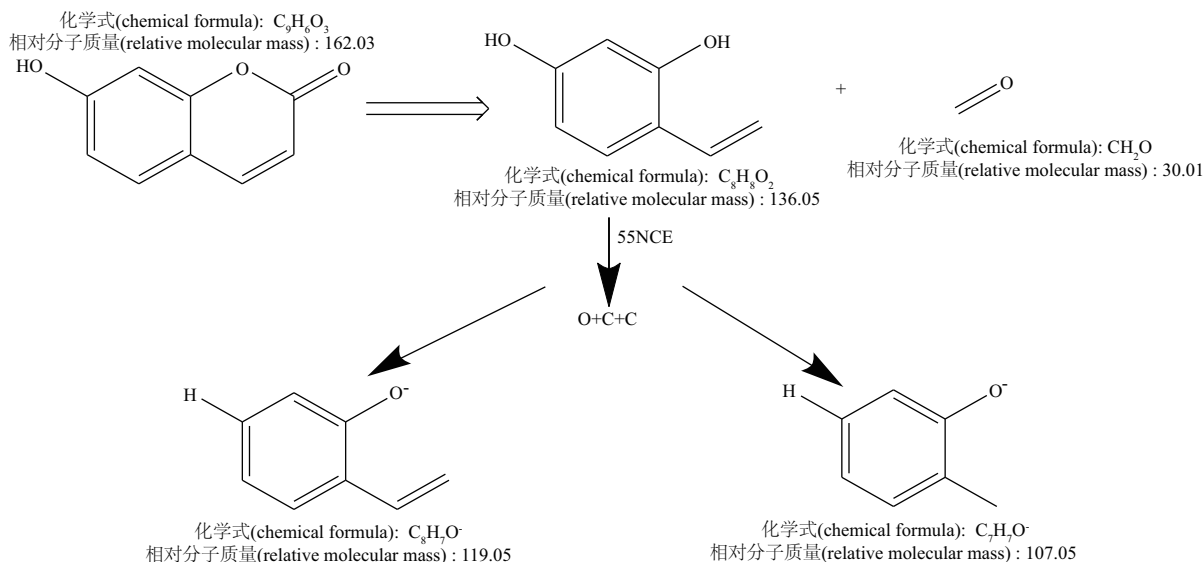


图3 7-羟基香豆素裂解机理

Fig. 3 Cleavage mechanism of 7-hydroxycoumarin

不饱和度为 6.5, 与软件计算结果一致, 经过与 mzCloud 光谱数据库比对, 匹配率高达 89.4%, 确定该化合物为秦皮素, 裂解途径见图 4。

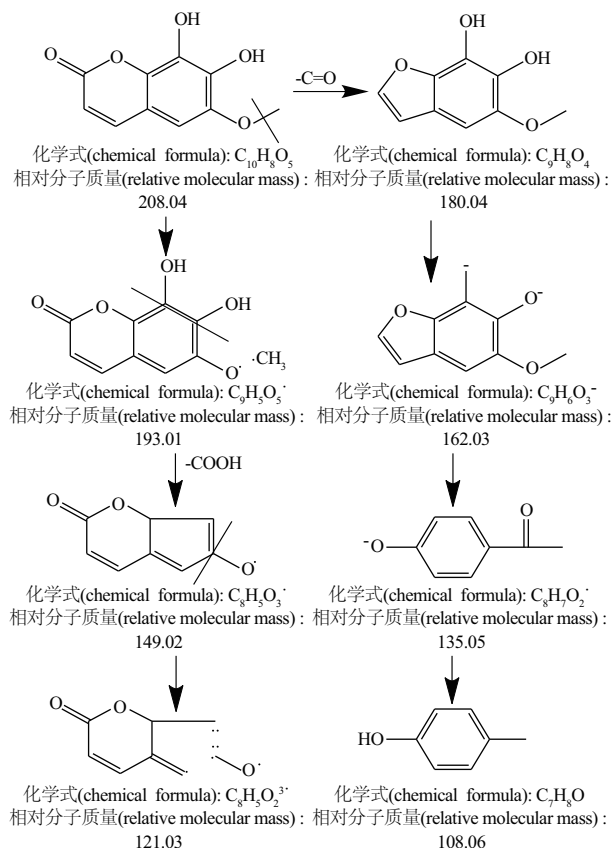


图4 秦皮素裂解机理

Fig. 4 Cracking mechanism of fraxetin

经 Xcalibur 软件处理, 发现在刺五加提取液和老鼠血浆的 MS 图中均出现 m/z 223.060 15 的准分子离子峰, 设定正负模式质量校正误差范围为 5×10^{-6} , 根据软件分析, 在 $[M + H]$ 模式下锁定 1 种加和离子化学式, 在 m/z 223.060 15 的 MS^2 光谱图下显示了 1 个信号强度为 1×10^8 的 m/z 223.060 15 的前体离子, 校正误差为 -0.403×10^{-6} , 经过分析质谱图, 发现该化合物的裂解规律与秦皮素大同小异, 不同之处在于低能量下首先发生去甲基基团, 随后发生的裂解都一致, 最终生成醛基取代苯环的氢形成的苯甲醛结构, 与秦皮素结构拟合后, 初步鉴定该化合物为异嗪皮啶。

结合 mzVault 和 Thermo Scientific OTCML 本地数据库给出该化合物匹配分数为 92.8, 数据库的二级光谱图下在 m/z 208.036 32、194.020 80、190.025 85、162.030 96、135.044 02、107.049 42 处出现了与实验数据相同的特征碎片峰, 文献报道该化合物计算化学参数中的不饱和度为 6.5, 与软件计算结果一致, 经过与 mzCloud 光谱数据库比对, 匹配率高达 92.2%, 经上述鉴定, 该化合物为异嗪皮啶, 裂解途径见图 5。

经 Xcalibur 软件处理, 发现在刺五加提取液和老鼠血浆的 MS 图中均出现 m/z 193.049 18 的准分子离子峰, 设定正负模式质量校正误差范围为 5×10^{-6} , 根据软件分析, 在 $[M + H]$ 模式下锁定 1 种加和离子化学式, 在 m/z 193.049 18 的 MS^2 光谱图下显示了

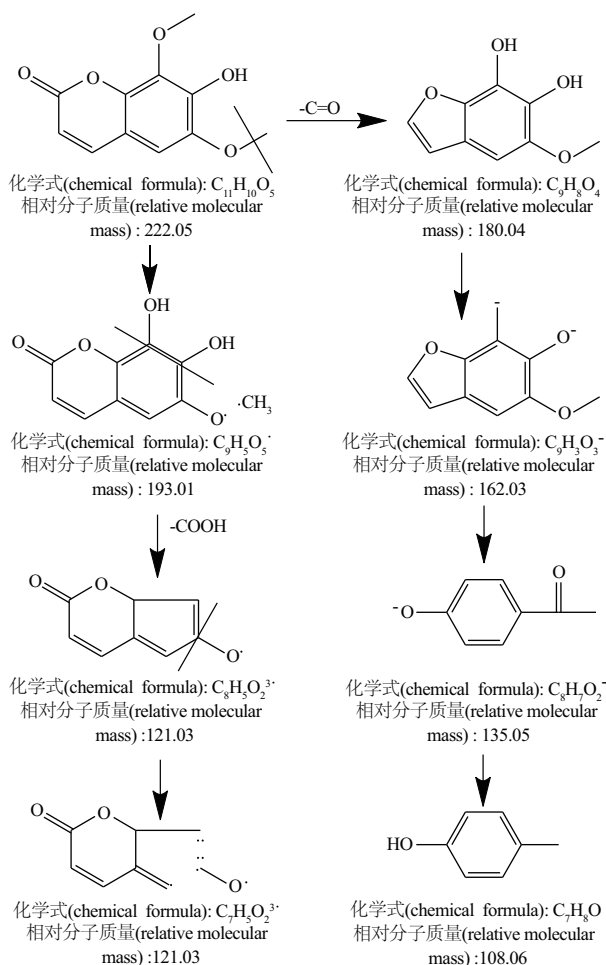


图5 异嗪皮啶裂解机理

Fig. 5 Cleavage mechanism of isoazopyridine

1 个信号强度为 6×10^5 的 m/z 193.049 18 的前体离子,校正误差为 -0.286×10^{-6} ,经过对数据裂解分析,20 能量下发现 4 个碎片离子 m/z 178.025 82、150.031 01、122.036 30、105.033 91,经过分析为陆续丢失甲基基团、羧基基团、羰基基团和羟基基团;在 60 能量下又发现 3 个碎片离子 m/z 165.054 35、137.059 60、133.028 35,为丢失 2 个羰基和甲基基团所形成,该裂解模式与秦皮素裂解规律和异嗪皮啶的去甲基化后续裂解规律类似,结合化学式初步鉴定该化合物为东莨菪内酯或异莨菪亭。它们均为苯丙素类化合物,最终碎片都为苯环被不同基团所取代的结构。东莨菪内酯与异莨菪亭属于同分异构体,其区别在于香豆素结构的 6 号位和 7 号位取代基的顺序,东莨菪内酯为羟基取代 7 号位,甲氧基取代 6 号位;而异莨菪亭为羟基取代 6 号位,甲氧基取代 7 号位。但由于质谱无法区分,因此选择与对照品保

留时间比对,最终鉴定为东莨菪内酯。

结合 mzVault 和 Thermo Scientific OTCML 本地数据库给出该化合物匹配分数为 95.9,数据库的二级光谱图下在 m/z 178.025 82、165.054 35、133.028 35、122.036 30 处出现了与实验数据相同的特征碎片峰,文献报道该化合物计算化学参数中的不饱和度为 6.5,与软件计算结果一致,经过与 mzCloud 光谱数据库比对,匹配率高达 93.7%,经上述鉴定,该化合物为东莨菪内酯,裂解途径见图 6。

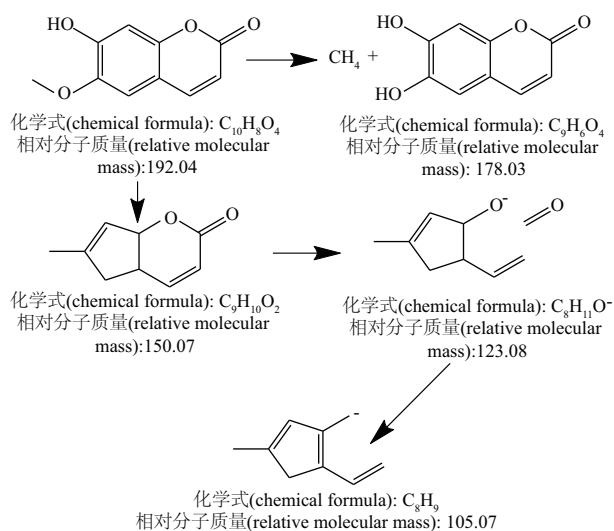


图6 东莨菪内酯裂解机理

Fig. 6 Cracking mechanism of scopolamine

3 结论

本研究根据 LC-MS/MS 裂解规律,定性刺五加在大鼠体内入血的 4 种木脂素成分并建立了 1 种体内分析方法,计算血浆中 4 个化学成分的药代动力学参数,包括达峰时间、达峰浓度、半衰期、药时曲线下面积、清除率、表观分布容积。统计结果显示,各组间差异的 P 均 >0.05 ,说明个体间的差异在实验可接受的误差范围内。4 个化合物的绝对生物利用度为 63%~78%,相对生物利用度为 82%~85%,说明刺五加水提物的生物利用度较好,本研究有助于为刺五加的临床应用提供参考。

参考文献

- [1] 朱英,韩雪梅,柯潇,等. HPLC-MS/MS 测定大鼠血浆中刺五加、贯叶连翘提取物主要活性成分浓度及其药理学研究[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(1): 46
- ZHU Y, HAN XM, KE X, et al. HPLC-MS/MS method for de-

- termination of the concentration of main active ingredients in the extracts of *Acanthopanax senticosus* and *Hypericum perforatum* L. and their pharmacokinetics in rats[J]. *Chin Pharm J*, 2021, 56(1):46
- [2] 张宇航, 邱智东, 傅超美, 等. 刺五加化学成分药动学特性及其体内代谢过程研究进展[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(16):334
ZHANG YH, QIU ZD, FU CM, *et al.* Research progress on the pharmacokinetics of *Acanthopanax senticosus* Harms chemical constituents and its metabolism *in vivo*[J]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, 41(16):334
- [3] 简勇, 丁茹, 刘舒, 等. 刺五加叶黄酮脂质体和滴丸的药动学差异比较[J]. *应用化学*, 2017, 34(1):118
JIAN Y, DING R, LIU S, *et al.* Comparison of the pharmacokinetics difference between *Acanthopanax* leaf flavonoids liposome and *Acanthopanax* leaf drop pills[J]. *Chin J Appl Chem*, 2017, 34(1):118
- [4] 范惠霞, 邓志鹏, 仲浩, 等. 刺五加注射液中3个主要活性成分与相应单体在大鼠体内的药动学比较[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(10):1921
FAN HX, DENG ZP, ZHONG H, *et al.* Pharmacokinetics of three main active components in *Acanthopanax* injection and corresponding monomers in rats[J]. *China J Chin Mater Med*, 2014, 39(10):1921
- [5] 王雪, 代朝, 方坚松. 刺五加防治神经退行性疾病的药理研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(16):4314
WANG X, DAI Z, FANG JS. Research progress of *Acanthopanax senticosus* in prevention and treatment of neurodegenerative diseases[J]. *China J Chin Mater Med*, 2022, 47(16):4314
- [6] 陈济民. 统计矩在药物动力学上的应用[J]. *沈阳药学院学报*, 1984(2):166
CHEN JM. Application of statistical moments in pharmacokinetics[J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 1984(2):166
- [7] 李洁, 刘子菡, 董凡, 等. 新绿原酸的大鼠体内代谢产物的UPLC-Q-TOF MS鉴定[J]. *中国现代中药*, 2020, 22(7):1048
LI J, LIU ZH, DONG F, *et al.* Metabolite identification of neochlorogenic acid in rats based on UPLC-Q-TOF MS[J]. *Mod Chin Med*, 2020, 22(7):1048
- [8] 黎娜, 杨淑婷, 陆苑, 等. 利用超高效液相色谱质谱联用分析羊耳菊7种成分在大鼠尿液中的排泄过程[J]. *中国药理学杂志*, 2019, 54(21):1797
LI N, YANG ST, LU Y, *et al.* Investigation of the excretion of seven constituents of *Inula cappaort* in rat urine by UPLC-MS/MS[J]. *Chin Pharm J*, 2019, 54(21):1797
- [9] 曾衍霖. 微量法在生物药剂学中的应用[J]. *中国医药工业杂志*, 1983(4):18
ZENG YL. The application of moment method in biopharmacy[J]. *Chin J Pharm*, 1983, (4):18
- [10] 严建业, 王元清, 伍红年, 等. 总量统计矩参数追踪肉桂在大鼠机体中的体内过程研究[J]. *中药材*, 2017, 40(11):2663
YAN JY, WANG YQ, WU HN, *et al.* Tracing the internal process of *Cinnamomum cassia* in rats by total statistical moment parameters[J]. *J Chin Med Mater*, 2017, 40(11):2663
- [11] 余健, 辛艳飞, 宣尧仙. 中药药代动力学研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2014, 32(6):1337
YU J, XIN YF, XUAN YX. Research progress in pharmacokinetics of traditional Chinese medicine[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2014, 32(6):1337
- [12] 严云良, 戴晓燕. 总量统计矩法评价祛瘀清热颗粒中大黄酸与大黄酚在家兔体内的药代动力学特征[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(3):520
YAN YL, DAI XY. Total quantity statistical moment analysis on pharmacokinetics of rhein and chrysophanol after oral administration of Quyu Qingre granules in normal and acute blood stasis rabbits[J]. *China J Chin Mater Med*, 2014, 39(3):520
- [13] 曹永孝. 药物代谢动力学经典模型的局限与改进[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2019, 40(5):669
CAO YX. Limitations and improvements of classical models of pharmacokinetics[J]. *J Xi'an Jiaotong Univ (Med Sci)*, 2019, 40(5):669
- [14] 王现珍, 姚景春, 许晓丽, 等. UPLC-MS/MS法检测大鼠血浆中新利司他杂质A的含量及其在药代动力学中的应用[J]. *药物分析杂志*, 2022, 42(4):637
WANG XZ, YAO JC, XU XL, *et al.* UPLC-MS/MS method to detect the content of cetilistat impurity A in rat plasma and its application in pharmacokinetics[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2022, 42(4):637
- [15] 封士兰, 胡芳弟, 赵健雄, 等. RP-HPLC法研究刺五加注射液中刺五加苷E、刺五加苷B在大鼠体内的药代动力学和组织分布特性[J]. *药物分析杂志*, 2006, 26(6):741
FENG SL, HU FD, ZHAO JX, *et al.* RP-HPLC determination of pharmacokinetics of eleutherococcuss eleutheroside E and eleutheroside B in rats plasma and tissues[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2006, 26(6):741

(本文于2023年6月11日收到)