

地黄叶总苷胶囊在幼龄大鼠体内毒代动力学研究

叶潇¹, 郑爽¹, 张佳宁¹, 于敏¹, 黄舒佳¹, 王宇¹, 肖华², 刘艳华^{2*}, 刘颖^{1*} (1. 中国食品药品检定研究院安全评价研究所, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176; 2. 四川美大康药业股份有限公司, 什邡 四川 618400)

摘要:目的 建立测定幼龄大鼠血浆中毛蕊花糖苷(地黄叶总苷胶囊主要成分)浓度的液相色谱-串联质谱联用(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)检测方法, 研究毛蕊花糖苷在幼龄 Wistar 大鼠重复灌胃给予不同剂量水平的地黄叶总苷胶囊后体内的暴露程度及毒代动力学特征。方法 血浆样品采用甲醇-乙腈(1:1)进行蛋白沉淀处理, 液相分离采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 以含体积分数 0.1% 甲酸水溶液-0.1% 甲酸乙腈溶液为流动相进行, 流速为 0.5 mL · min⁻¹, 进样量为 2 μL; 质谱检测采用电喷雾负离子(ESI⁻)模式和多重反应监测(MRM)扫描方式, 毛蕊花糖苷监测离子对 623.1/160.9, 染料木素监测离子对 269.0/158.9, 用作内标; 通过建立的 LC-MS/MS 法分析测定地黄叶总苷胶囊重复给药幼龄 Wistar 大鼠毒性试验首、末次后大鼠血浆中毛蕊花糖苷的药物浓度, 绘制药-时曲线并计算动力学参数。结果 建立了基于 LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中毛蕊花糖苷含量的方法并进行了方法学验证, 该方法可在 2~500 ng · mL⁻¹ 内准确测定毛蕊花糖苷含量。幼龄 Wistar 大鼠重复灌胃给予地黄叶总苷胶囊内容物混悬液 8 周, 在 30~750 mg · kg⁻¹ 内, 体内毛蕊花糖苷的暴露量无蓄积现象; 体内暴露量与所给予的剂量不呈线性动力学特征趋势。结论 本研究应用 LC-MS/MS 技术建立的方法可用于大鼠血浆中地黄叶总苷胶囊中毛蕊花糖苷浓度的测定, 并支持完成了地黄叶总苷胶囊在幼龄大鼠体内的毒代动力学研究。

关键词:地黄叶总苷胶囊; 毛蕊花糖苷; 液相色谱-串联质谱联用; 毒代动力学

doi:10.11669/cpj.2025.06.007 中图分类号:R966 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2025)06-0612-08

Toxokinetics Study of *Rehmannia glutinosa* Leaf Total Glycosides Capsules in Young Rats

YE Xiao¹, ZHENG Shuang¹, ZHANG Jianing¹, YU Min¹, HUANG Shujia¹, WANG Yu¹, XIAO Hua², LIU Yanhua^{2*}, LIU Ying^{1*} (1. Beijing Key Laboratory for Safety Evaluation of Drugs, Institute for Safety Evaluation, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China; 2. Sichuan Medco Pharmaceutical Stock Co., Ltd., Shifang 618400, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an LC-MS/MS method for determining the concentration of acteoside (the main component of *Rehmannia glutinosa* leaf total glycosides capsules) in the plasma of young rats and investigate the exposure levels and toxicokinetic characteristics of acteoside following repeated oral gavage administration of different doses of *Rehmannia glutinosa* leaf total glycosides capsules. **METHODS** Plasma samples were processed using protein precipitation with methanol-acetonitrile (1:1). Chromatographic separation was performed on a Waters ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), with mobile phase consisting of 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in acetonitrile, at a flow rate of 0.5 mL · min⁻¹. The injection volume was 2 μL. Mass spectrometry detection was carried out using electrospray ionization in negative mode (ESI⁻) and multiple reaction monitoring (MRM). The ion transitions monitored were 623.1/160.9 for acteoside and 269.0/158.9 for genistein which served as the internal standard. The established LC-MS/MS method was applied to analyze the plasma concentrations of acteoside in young Wistar rats after the first and last administrations of *Rehmannia glutinosa* leaf total glycosides capsules during a toxicity study. Pharmacokinetic profiles were constructed and kinetic parameters were calculated. **RESULTS** An LC-MS/MS method was developed and validated for the accurate determination of acteoside in rat plasma within a concentration range of 2–500 ng · mL⁻¹. Young Wistar rats were repeatedly gavaged with suspensions of *Rehmannia glutinosa* leaf total glycosides capsules for 8 weeks at dose levels ranging from 30 to 750 mg · kg⁻¹. No accumulation of acteoside exposure was observed within this dose range, and the exposure did not exhibit linear kinetics with increasing dose. **CONCLUSION** The developed LC-MS/MS method is applicable for measuring the concentration of acteoside from *Rehmannia glutinosa* leaf total glycosides capsules in rat plasma and supports toxicokinetic studies in young rats.

KEY WORDS: *Rehmannia glutinosa* leaf total glycosides capsule; acteoside; LC-MS/MS; toxicokinetics

作者简介:叶潇,女,博士,助理研究员 研究方向:药动学 *通讯作者:刘颖,女,博士,研究员 研究方向:药动学 Tel:(010) 67872233-8072;刘艳华,男,学士,助理研究员 研究方向:药物经济学 Tel:(0838)8101894

地黄叶,来源于玄参科多年生草本植物地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch.)的干燥茎叶^[1]。传统上,地黄的根部常以其滋阴补肾、清热凉血的功效作为常用中药而闻名,被制成生地黄或熟地黄广泛应用于临床^[2]。然而,地黄叶早在唐代《食疗本草》中就有记载可外用于皮肤病的治疗^[3],且现代研究表明二者具有相似的化学成分组成^[4-5],因而地黄叶中的丰富活性成分也逐渐受到关注^[6-10]。地黄叶总苷胶囊是基于地黄叶中提取的苯乙醇苷类成分而开发的中成药,临床上主要用于成年人慢性肾小球肾炎等肾脏疾病的治疗^[11-13]。其中,毛蕊花糖苷为其主要成分^[4,14],研究表明其不仅具有抗炎^[15]、抗肿瘤^[16]、神经保护^[17]等多种生物活性,在治疗肾炎类模型动物方面也展现出了良好的活性表现^[18-19]。

地黄叶总苷胶囊在成人中的药理作用和安全性已通过多项研究得以证实^[11-13,20-22],然而,对于儿童,尤其是针对幼龄儿童或幼龄动物模型(如幼龄大鼠)的安全性研究尚未见相关报道。毒代动力学(toxicokinetics,TK)是非临床安全性评价的重要研究内容之一,可以阐明药物在动物体内全身暴露量与剂量和持续时间相联系的程度,并预测药物在人体暴露时的潜在风险^[23]。因此,本研究将开展地黄叶总苷胶囊在幼龄大鼠的TK研究,采用液相色谱-串联质谱联用(LC-MS/MS)法测定Wistar幼龄大鼠血浆中地黄叶总苷胶囊主要成分毛蕊花糖苷的浓度,旨在获取地黄叶总苷胶囊幼龄动物相关毒理学数据,以期地为地黄叶总苷胶囊在儿科人群中的应用提供参考依据。此外,为了确保TK研究的科学性和可靠性,本研究所建立的生物分析方法的验证和样品分析将遵照人用药品技术要求国际协调理事会(the International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)发布的《M10:生物分析方法验证和研究样品分析》^[24](M10)的规定进行。

1 实验材料

1.1 药品与试剂

毛蕊花糖苷、染料木素(批号为:111530-201914、111704-202104,含量为:95.2%、98.8%,中国食品药品检定研究院);乙腈、甲醇(批号分别为:222372、223948,质谱级,美国ThermoFisher公司);甲酸(批号:207868,质谱级)、抗坏血酸(批号:WX-BC7324V,分析级,美国Sigma公司);超纯水(Milli-

Q纯化系统自制);地黄叶总苷胶囊内容物(批号:220601,每袋2 kg,地黄叶总苷含量:37.5%,四川美大康药业股份有限公司)。

1.2 仪器

四极杆质谱仪(型号:Xevo TQ-XS, ZSpray ESCI离子源,系统工作软件MassLynx 4.2)、超高效液相(型号:ACQUITY UPLC I-Class PLUS)(美国Waters公司);万分之一电子天平和百万分之一电子天平(型号:MSE2442S、MSA36S型,德国Sartorius公司);涡旋仪(型号:Vortex-GENIE2 G560E,美国Scientific Industries公司);超纯水仪(型号:Milli-Q Advantage A10,美国Millipore公司)。

1.3 实验动物

Wistar大鼠(3周龄,雌雄各半,体质量 δ :57.1~88.3 g,体质量 η :49.3~79.2 g)共80只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证编号:SCXK(京)2021-0006。实验开始前,适应性饲养7 d,饲养于SPF级动物屏障中,饲养环境温度范围:20~26℃,日温差不超过3℃,相对湿度:40%~70%,每小时至少换气15次,每天12 h照明时间。本实验经国家药物安全监测中心实验动物伦理委员会批准(编号:IACUC-2023-032)。

2 实验方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 地黄叶总苷给药制剂的制备 取地黄叶总苷胶囊内容物适量,加入纯水适量,用搅拌器以 $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速搅拌10 min,配成浓度为2、10、50 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (地黄叶总苷浓度)的地黄叶总苷胶囊内容物混悬液。

2.1.2 对照品储备液的制备 取毛蕊花糖苷对照品,精密称定,加入体积分数为0.1%甲酸-30%甲醇水溶液适量,振摇使溶解,得到质量浓度为1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。 -20°C 避光保存。取内标染料木素对照品,精密称定,加入甲醇适量,振摇使溶解,得到浓度为1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标储备液。 $2\sim 8^\circ\text{C}$ 避光保存。

2.1.3 对照品及质控样品工作液的制备 分别精密吸取毛蕊花糖苷对照品储备液适量,用体积分数为0.1%甲酸-30%甲醇水作稀释液系列稀释,得到30、50、100、250、500、1 000、2 500和5 000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列标准工作液。同法制备质控样品工作液,得到80、2 000和4 000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$

的质控工作液。

2.1.4 标准曲线及质控样品的制备 分别精密量取 45 μL 大鼠空白混合血浆,加入上述浓度的毛蕊花糖苷系列工作液 5 μL ,涡旋混匀 2 min,得到质量浓度为 3~500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的毛蕊花糖苷校正标样。同法制备得到质量浓度为 8、200 和 400 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质控样品。

2.2 分析方法

2.2.1 色谱方法 采用 Waters ACQUITY UPLC™ HSS T3 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm),配有 0.2 μm 在线过滤器;流动相 Phase A 是体积分数为 0.1% 甲酸水溶液,Phase B 是体积分数 0.1% 甲酸乙腈溶液,梯度洗脱 (0~1 min, 10%~30% B; 1~3.5 min, 30%~40% B; 3.5~4.5 min, 40%~90% B; 4.5~4.6 min, 90%~10% B; 3.6~5.5 min, 10%~10% B);柱温为 50 $^{\circ}\text{C}$,进样器温度为 4 $^{\circ}\text{C}$,进样量为 2 μL 。

2.2.2 质谱方法 电喷雾负离子化电离源 (ESI⁻),离子源温度 150 $^{\circ}\text{C}$ 、毛细管电压 0.5 kV、脱溶剂气温度 550 $^{\circ}\text{C}$ 、脱溶剂气流速 1 000 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ 、锥孔气流速 150 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ 、雾化气压力 0.7 MPa、碰撞气氩气流速 0.15 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.3 给药方式和给药剂量

为与该药临床给药方式一致,幼龄 Wistar 大鼠采用灌胃给药途径,连续给药 8 周,每天 1 次。按照地黄叶总苷胶囊内容物进行换算,应用于青少年 (6~18 岁) 的慢性肾小球肾炎的临床拟用最大日剂量为 15 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,设置给药剂量为 30 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (低剂量),150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (中剂量),750 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (高剂量),约为临床最大拟用剂量的 2、10 和 50 倍。

2.4 样品前处理

取血浆样品 50 μL 置于含有 10 μL 体积分数为 0.1% 抗坏血酸水溶液的 EP 管中,加入甲醇-乙腈 (1:1) 溶液 150 μL (含内标染料木素 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$),涡旋振荡 2 min,13 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液 2 μL 进样分析。

2.5 方法学考察

2.5.1 选择性 分别取 6 个不同个体的空白 Wistar 大鼠血浆基质和 1 个空白溶血基质,按照“2.4”项下方法操作进行样品前处理,得到色谱图,考察空白大鼠 (溶血) 血浆对分析物和内标保留时间处是否存在干扰组分引起显著响应。

2.5.2 线性关系和定量下限 (lower limit of quantitation, LLOQ) 取按“2.1.3”项下制备的标准曲线

系列样品,按“2.4”项进行处理并进样分析,记录色谱图和峰面积。以分析物与内标峰面积的比值 (Y) 作为纵坐标,各分析物浓度 (X) 作为横坐标,采用 $1/X^2$ 加权最小二乘法进行线性回归,求得回归方程。

2.5.3 残留效应 计算在 3 个分析批中定量上限 (upper limit of quantification, ULOQ) 进样后空白血浆样品中毛蕊花糖苷和内标峰面积占所在该分析批 LLOQ 峰面积的比例,以考察残留效应并尽量减少残留。

2.5.4 准确度与精密度 取按“2.1.4”项下方法制备的定量下限、低、中和高浓度质控样品,按“2.4”项下方法处理并进样分析,进行批内与批间的准确度、精密度考察。每一浓度平行制备 5 份样品,计算批内精密度;重复操作在至少两天内制备并分析 3 批样品,计算批间精密度。

2.5.5 基质效应 取 6 个不同来源的空白 Wistar 大鼠血浆和 1 个空白溶血基质制备低浓度和高浓度质控样品,每一浓度平行 3 份,按“2.4”项下进行处理并进样分析,计算每一个来源基质的准确度和精密度以考察不同来源的基质效应。

2.5.6 稳定性考察 取按“2.1.4”项下方法制备的低浓度和高浓度质控样品,每一浓度至少平行 3 份,按“2.4”项处理并进样分析,分别考察样品前处理 (室温放置 1 h)、样品冻融 ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~室温 3 次冻融循环)、样品处理后 (自动进样器 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h) 和长期 ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 103 d) 稳定性,计算质控样品中分析物的浓度偏差。

2.5.7 稀释可靠性 按“2.1.4”项下方法用毛蕊花糖苷储备液制备大于 ULOQ 的稀释质控样品 (Dilution QC),用 Wistar 大鼠空白混合血浆 10 倍和 100 倍稀释 Dilution QC 样品,得到质量浓度为 500 和 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的稀释可靠性样品,每个稀释可靠性样品平行配制 5 个样品。计算稀释可靠性样品的平均准确度和精密度。

2.5.8 进样重现性 取按“2.4”项下制备的标曲样品和 5 个低、中和高浓度质控样品储存于自动进样器 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h 后重新进样,以重新进样的质控样品的精密度和准确度确定处理后样品重新进样的可行性。

2.6 TK

TK 血浆样品的采集于实验周期中的首次给药日和 8 周给药结束末次给药日 (共 2 次) 进行。首次和末次采血时间点是给药前、给药后 5、20、

40 min、1、2、4、6、24 h, 5 只雌性和 5 只雄性动物采集给药前、给药后 20 min、1、4、24 h 时间点, 另 5 只雌性和 5 只雄性动物采集给药后 5、40 min、2、6 h 时间点, 2 组交替采血。首次给药时, 因动物周龄较小、体质量较轻, 每只每次约 0.2 mL; 末次给药, 每只每次约 0.6 mL。采集血样置于含乙二胺四乙酸二钾 (EDTA-2k) 抗凝的抗凝管中, 轻轻颠倒混匀以抗凝。血样采集后将离心管置于冰袋或碎冰上, 注意避光, 及时记录采血时间, 采血后 1 h 内尽快对样本进行离心 (4 °C, 4 000 r · min⁻¹, 10 min), 分离血浆。

选取最大血药浓度 (ρ_{\max}) 附近和消除相的样品进行样品再分析 (incurred sample reanalysis, ISR), 重新分析约 10% 的 TK 样品, 至少 67% 的样品再次分析结果其原始分析测得的浓度和重新分析测得的浓度之间的差异应在两者均值的 $\pm 20\%$ 范围内。

采用经验证的超高效液相色谱-串联质谱联用 (UPLC-MS/MS) 方法对 Wistar 大鼠血浆样品中的毛蕊花糖苷进行分析, 获得不同时间点的各分析物浓度数据, 采用 Phoenix WinNonlin[®] 8.3 软件 (美国) 非房室模型进行处理和统计分析, 计算药代动力学参数, 将处理后的数据导入 GraphPad Prism 7.0 绘制血浆药物浓度-时间曲线。实验数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

3 实验结果

3.1 质谱化合物信息

按“2.2”项下对已知结构对照品进行信息采集, 将化合物离子模式、定量离子对以及相关质谱信息进行整理 (表 1)。

表 1 毛蕊花糖苷及内标物质质谱参数

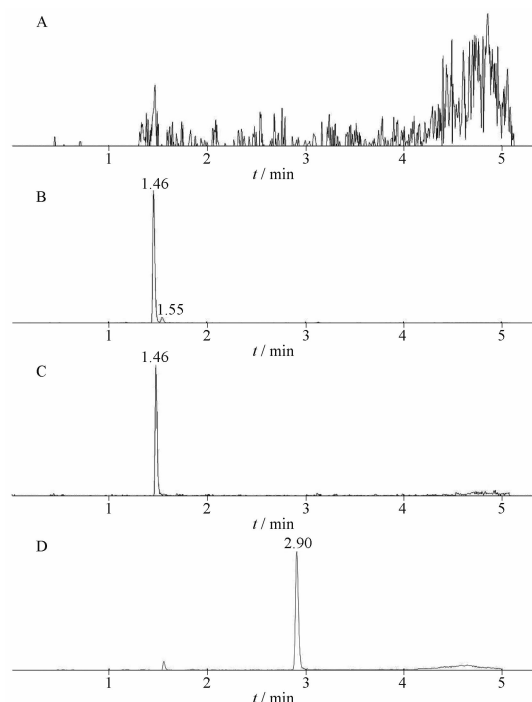
Tab. 1 Mass spectrum parameters of acetoside and internal standards

Component	Ion mode	Quantification ion pair	Cone voltage/V	Collision energy/eV
Acetoside	[M-H] ⁻	623.1 \rightarrow 160.9	68	36
Genistein	[M-H] ⁻	269.0 \rightarrow 158.9	60	30

3.2 方法学考察

3.2.1 选择性 毛蕊花糖苷的保留时间约为 1.50 min, 7 个 (S1 ~ S7) 批次的选择性样品在毛蕊花糖苷保留时间处干扰峰的峰面积均小于 LLOQ 毛蕊花糖苷峰面积的 20%。内标的保留时间约为 2.90 min, 7 个选择性样品在内标保留时间处干扰峰的峰面积为 LLOQ 内标峰面积的 5%, 该方法的选

择性良好。分析物代表性色谱图见图 1。



A - 空白血浆; B - 最低定量下限样品; C - 幼龄大鼠血浆给药 40 min 后的含药血浆; D - 内标 (染料木素)。

A - blank plasma; B - 定量下限 (LLOQ); C - drug-containing plasma of young rats 40 min after administration; D - IS (genistein).

图 1 毛蕊花糖苷及内标 (IS) 在 Wistar 大鼠血浆中的代表性多反应监测 (MRM) 色谱图

Fig. 1 Representative MRM chromatograms of acetoside and internal standard (IS) in Wistar rats plasma

3.2.2 标准曲线和定量下限 毛蕊花糖苷标准曲线范围为 3 ~ 500 ng · mL⁻¹, 标曲回归方程为 $Y = 1.104X + 0.236$, $r = 0.9991$, 其随行标曲 r 均大于 0.9900。除 LLOQ 的准确度在 $\pm 20\%$ 内, 其余标准曲线样品的准确度均在 85% ~ 115%, 说明大鼠血浆中毛蕊花糖苷在该浓度范围内线性关系良好。

3.2.3 残留效应 3 个分析批中 ULOQ 后空白血浆样品中毛蕊花糖苷峰面积低于相应 ULOQ 峰面积的 20%, 3 个分析批 ULOQ 标样后的空白血浆样品的内标峰面积也低于 LLOQ 内标峰面积的 5% (表 2)。

3.2.4 准确度和精密度 LLOQ 样品的批内、批间准确度在 80% ~ 120%, 精密度相对标准偏差 (RSD) $\leq 20\%$; 低、中、高 3 个浓度 QC 样品批内、批间准确度均在 85% ~ 115%, 精密度 RSD 均 $\leq 15\%$, 根据其随行标准曲线计算 QC 样品浓度 (表 3)。

表2 大鼠血浆毛蕊花糖苷和内标残留效应测定结果

Tab. 2 Determination results of residues of acetoside in rat plasma and internal standard (IS)

Batches	Area of acetoside in blank sample after ULOQ	Area of IS in blank sample after ULOQ	20% Area of verbasoside in LLOQ	5% Area of IS in LLOQ
1	-	146.53	128.39	401.19
2	4.55	188.16	114.30	379.81
3	13.70	130.47	106.22	299.55

表3 大鼠血浆中毛蕊花糖苷准确度与精密度结果。 $\bar{x} \pm s$

Tab. 3 Precision and accuracy of the assay of acetoside in rat plasma. $\bar{x} \pm s$

ρ (Theoretical) /ng · mL ⁻¹	Intra-day (n = 5)			Inter-day (n = 3)		
	ρ (Measured)/ng · mL ⁻¹	Accuracy/%	RSD/%	ρ (Measured)/ng · mL ⁻¹	Accuracy/%	RSD/%
3	3.38 ± 0.29	112.61	8.53	3.26 ± 0.23	118.69	7.07
8	8.01 ± 0.16	101.26	2.02	8.01 ± 0.51	100.01	6.38
200	194.58 ± 10.69	97.29	5.49	194.28 ± 17.53	97.14	9.02
400	383.26 ± 19.81	95.81	5.17	395.77 ± 29.94	98.94	7.57

3.2.5 基质效应 7批血浆样品的准确度在88.27%~106.19%,均在标示浓度的±15%以内,并且所有单个来源批次基质的精密度在2.45%~10.45%,均不大于15%,见表4。

表4 大鼠血浆中毛蕊花糖苷基质效应结果。 $\bar{x} \pm s$

Tab. 4 Results of matrix effect of acetoside in rat plasma. $\bar{x} \pm s$

Batches	ρ (Theoretical)	ρ (Measured)	Accuracy	RSD
	/ng · mL ⁻¹	/ng · mL ⁻¹ (n = 3)	/%	/%
1	8	8.07 ± 0.59	100.91	7.28
	400	388.80 ± 23.04	97.20	5.93
2	8	7.77 ± 0.30	97.10	3.86
	400	406.82 ± 13.27	101.71	3.26
3	8	8.50 ± 0.41	106.19	4.84
	400	399.19 ± 19.35	99.80	4.85
4	8	7.48 ± 0.78	93.52	10.45
	400	353.06 ± 19.28	88.27	5.46
5	8	7.48 ± 0.65	93.52	8.69
	400	354.78 ± 29.09	88.69	8.20
6	8	8.30 ± 0.52	103.76	6.23
	400	382.49 ± 9.38	95.62	2.45
7	8	7.45 ± 0.25	93.17	3.30
	400	391.52 ± 15.64	97.88	3.99

3.2.6 稳定性考察结果 大鼠血浆样品前处理(室温放置1h)、样品冻融(-70℃~室温3次冻融

循环)、样品处理后(自动进样器4℃放置24h)和长期(-70℃放置103d)稳定性质控样品中毛蕊花糖苷浓度偏差不超过标示浓度的±15%,结果见表5。

表5 大鼠血浆中毛蕊花糖苷稳定性结果。 $\bar{x} \pm s$

Tab. 5 Stability test of acetoside in rat plasma. $\bar{x} \pm s$

Items	ρ (Theoretical)	ρ (Measured)	Accuracy	RSD
	/ng · mL ⁻¹	/ng · mL ⁻¹	/%	/%
Room temperature (1 h, n = 3)	8	6.85 ± 0.28	85.68	4.06
	400	342.87 ± 1.97	85.72	1.97
Freeze-thaw 3 cycles (-80℃, n = 3)	8	7.10 ± 0.06	88.78	0.82
	400	386.29 ± 18.65	96.57	4.83
103 d (n = 3)	8	7.75 ± 0.15	96.89	1.96
	400	389.04 ± 17.42	97.26	4.48
Auto-sampler (4℃, 28 h, n = 5)	8	9.02 ± 0.59	112.78	6.51
	400	450.86 ± 29.11	112.71	6.46

3.2.7 稀释可靠性 对超出ULOQ的稀释质控样品用基质稀释10倍和100倍后毛蕊花糖苷测定结果的准确度在真实值的±15%之内,精密度也低于15%的要求,表明大鼠血浆样品稀释不影响准确度和精密度,见表6。

表6 大鼠血浆中毛蕊花糖苷稀释可靠性结果。n = 5, $\bar{x} \pm s$

Tab. 6 Dilution integrity of acetoside in rat plasma. n = 5, $\bar{x} \pm s$

Dilution Factor	ρ (Nominal)/ng · mL ⁻¹	ρ (Measured)/ng · mL ⁻¹	ρ (Calculated)/ng · mL ⁻¹	Accuracy/%	RSD/%
10	5 000	486.26 ± 20.23	4 862.62 ± 202.27	-2.75	4.16
100	5 000	46.32 ± 2.40	4 632.14 ± 239.60	-7.36	5.17

3.3 TK 结果

幼龄 Wistar 大鼠,雌雄各半,分两组交替采血,

每时间点10只动物,30、150、750 mg · kg⁻¹3个剂量组首、末次TK雌性和雄性幼龄大鼠平均血药浓

度-时间曲线见图2。从3个剂量组地黄叶总苷胶囊内容物连续给药8周的幼龄大鼠体内特征研究中可以看出,灌胃给药后,地黄叶总苷胶囊中主要成分毛蕊花糖苷在给药后5 min~1 h内血药浓度吸收至峰值,之后开始消除;部分个体在首次给药后1 h后即消除至定量下限 $3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以下,末次给药后部分个体在2 h后即消除至定量下限以下;3个剂量的体内血药浓度与剂量呈正相关。此外,辅料对照组首次TK与末次TK均未检测到毛蕊花糖苷。

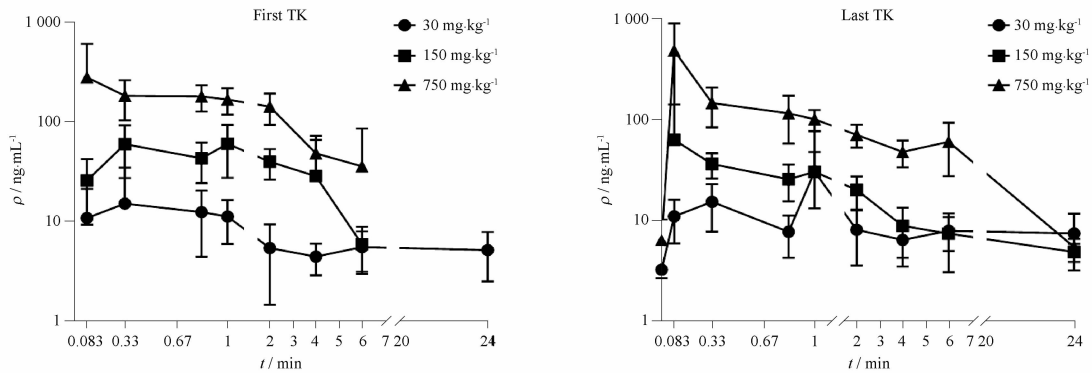


图2 Wistar 幼龄大鼠口服地黄叶总苷胶囊后体内毛蕊花糖苷血药浓度-时间曲线。n=5, $\bar{x} \pm s$

Fig. 2 Plasma concentration-time curve of acetoside in young Wistar rats after oral administration of *Rehmannia glutinosa* leaf total glycosides capsules. n=5, $\bar{x} \pm s$

表7 毛蕊花糖苷毒代动力学参数。n=5

Tab. 7 Toxicokinetic parameters of acetoside. n=5

$\rho/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	t	t_{max}/h	$\rho_{\text{max}}/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\text{AUC}_{0-24 \text{ h}}/\text{h} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{h} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\text{MRT}_{0-\infty}/\text{h}$
30	First	0.33	18.31	134.53	350.39	73.82
	Last	1	35.37	195.24	345.28	41.39
150	First	1	69.47	261.51	372.37	11.73
	Last	0.083	63.22	211.41	353.51	23.98
750	First	0.083	270.14	590.62	722.15	3.50
	Last	0.083	486.92	897.17	950.03	8.13

注: MRT - 平均滞留时间。

Note: MRT - mean residence time.

低剂量组 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 地黄叶总苷胶囊连续给药8周,末次给药后体内(以毛蕊花糖苷计)的 ρ_{max} 是首次给药 ρ_{max} 的1.93倍,血药浓度-时间曲线下面积($\text{AUC}_{0-24 \text{ h}}$)是首次给药 $\text{AUC}_{0-24 \text{ h}}$ 的1.45倍;中剂量组 $150 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 地黄叶总苷胶囊末次给药后体内(以毛蕊花糖苷计)的 ρ_{max} 是首次给药 ρ_{max} 的0.91倍, $\text{AUC}_{0-24 \text{ h}}$ 是首次给药 $\text{AUC}_{0-24 \text{ h}}$ 的0.81倍;高剂量组 $750 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 地黄叶总苷胶囊末次给药后体内(以毛蕊花糖苷计)的 ρ_{max} 是首次给药 ρ_{max} 的1.80倍, $\text{AUC}_{0-24 \text{ h}}$ 是首次给药 $\text{AUC}_{0-24 \text{ h}}$ 的1.52倍。其中,低剂量组和高剂量组首、末次 ρ_{max} 和 $\text{AUC}_{0-24 \text{ h}}$ 相差

对 ρ_{max} 附近和消除相中超过10%的TK样品进行了再分析,83.33%血浆样品的复测值与初测值的差异在两者均值的 $\pm 20\%$ 范围内,说明所建立的方法满足TK测定的要求。

在首次、末次给药阶段,分别将各剂量组内所有同性别幼龄大鼠的血药浓度计算均值,以均值进行非房室模型拟合,得到首、末次TK特征研究中毛蕊花糖苷3个剂量雌性幼龄大鼠和雄性幼龄大鼠的毒代动力学参数,结果见表7。

较多,可能是因为两组动物交替采血的方式增加了个体间的差异,从而导致了血药浓度的波动而造成。采用SPSS独立样本t检验比较重复给药8周前后的体内暴露是否存在差异,结果显示P值大于临界值0.05,表明首、末次给药后的毛蕊花糖苷体内暴露量无统计学意义的区别。因此认为地黄叶胶囊内容物在剂量 $30 \sim 750 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 内,幼龄大鼠连续灌胃给予8周,体内毛蕊花糖苷的暴露量无蓄积现象。

幼龄Wistar大鼠给予地黄叶总苷胶囊内容物的3个剂量之比是1:5:25,首次给药后3个剂量

组体内地黄叶总苷胶囊内容物(以毛蕊花糖苷计) ρ_{\max} 之比是1:3.8:14.7,表明随着剂量的增加, ρ_{\max} 的增加并不是线性的;首次给药后3个剂量组体内地黄叶总苷胶囊内容物(以毛蕊花糖苷计) $AUC_{0-24\text{ h}}$ 之比是1:1.9:4.4,同样表明随着剂量的增加, $AUC_{0-24\text{ h}}$ 的增加不是线性的。而末次给药后3个剂量组地黄叶总苷胶囊内容物(以毛蕊花糖苷计) ρ_{\max} 之比是1:1.8:13.8,说明随着给药次数的增加,高剂量组的 ρ_{\max} 与低剂量组之间的差距变小;3个剂量组地黄叶总苷胶囊内容物(以毛蕊花糖苷计) $AUC_{0-24\text{ h}}$ 之比是1:1.1:4.6,表明高剂量组与低剂量组之间 $AUC_{0-24\text{ h}}$ 的差距在重复给药后有所减小。从上述结果可看出,Wistar大鼠给予3个剂量组地黄叶总苷胶囊内容物(以毛蕊花糖苷计)的 ρ_{\max} 和 $AUC_{0-24\text{ h}}$ 增加的比例低于剂量增加比例;且随着剂量的增加, ρ_{\max} 和 $AUC_{0-24\text{ h}}$ 的增加呈现非线性关系,并且在重复给药之后,高剂量组与低剂量组之间的毒动学参数差异有所减小。这提示地黄叶总苷胶囊(以毛蕊花糖苷计)可能存在非线性的药动学特征,特别是在较高剂量下或在重复给药的情况下。

4 讨论

本研究依据ICH发布的M10指导原则,建立了一种基于LC-MS/MS技术测定大鼠血浆中毛蕊花糖苷的生物分析方法。在方法建立过程中,发现毛蕊花糖苷存在降解的可能性。根据相关文献报道,毛蕊花糖苷因其结构中含有邻二酚羟基以及糖苷键,因此在高温、高pH和光照条件下容易发生氧化降解^[25]。因此,在实验过程中采取了一系列措施确保毛蕊花糖苷的稳定性,在样品预处理过程中添加体积分数1%的抗坏血酸以防止其氧化降解,并在方法学验证阶段分别考察了室温放置1、2和4h的稳定性以及多次冻融对毛蕊花糖苷稳定性的潜在影响。此外,在收集TK样品过程中避光,将收集到的TK样本立即放置于碎冰中,快速完成样本的分离和储存。

TK研究结果显示,地黄叶总苷胶囊的主要成分——毛蕊花糖苷,在幼龄大鼠体内的消除速度较快,这与文献[26]中报道的毛蕊花糖苷单体给药后在大鼠体内的消除趋势相似。而地黄叶总苷胶囊的主要成分毛蕊花糖苷在幼龄大鼠体内的TK行为表现出一定的非线性特征,即随着剂量的增加, ρ_{\max} 和 $AUC_{0-24\text{ h}}$ 的增加比例低于剂量增加的比

例。这种非线性现象可能是在高剂量下,地黄叶总苷胶囊中的活性成分达到饱和,导致吸收效率下降;也可能随着剂量的增加,负责代谢这些成分的酶系统可能会达到饱和状态,从而影响药物的代谢速率。此外,在末次给药后, ρ_{\max} 和 $AUC_{0-24\text{ h}}$ 的变化趋势与首次给药虽有所不同,但值得注意的是,这些变化并没有显示出明显的蓄积效应,即随着给药次数的增加,药物的暴露量并未显著累积。这些发现对于指导地黄叶总苷胶囊在儿童患者中的合理剂量选择具有重要意义。考虑到药物在幼龄大鼠体内的非线性药动学特性,在未来应用于儿童患者时应注意药物的剂量调整,并在后续研究中利用多种动物模型进行比较研究,以更好地理解跨物种药动学差异,确保地黄叶总苷胶囊可以应用于儿童患者。

REFERENCES

- [1] Beijing Municipal Health Bureau. *Beijing standards for Chinese herbal medicines* [M]. Beijing: Capital Normal University Press, 1998: 313.
- [2] TIAN M P, DU Q, XIE X L, *et al.* Advances in the resource chemistry of *Rehmannia* [J]. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2021, 49(9): 22.
- [3] MENG S, ZHANG D, WU S J, *et al.* Food therapy with Chinese herbs(中草药食品疗法) [M]. Beijing: China Commer Press, 1992: 529.
- [4] PANG J. Study on Active ingredients and quality control of *Rehmannia leaf* [D]. Jinzhong: Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, 2019.
- [5] XU J C, GAO M B, WANG T, *et al.* Determination of catalpol content in *Rehmannia leaf*, fresh *Rehmannia*, and prepared *Rehmannia* by HPLC [J]. *Guangzhou Chem Ind* (广州化工), 2015, 43(12): 104.
- [6] LI J H, LI J, WANG J M, *et al.* Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Rehmannia leaf* [J]. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2016, 36(19): 4926.
- [7] DAI X, SU S, CAI H, *et al.* Protective effects of total glycoside from *Rehmannia glutinosa* leaves on diabetic nephropathy rats via regulating the metabolic profiling and modulating the TGF- β 1 and Wnt/ β -Catenin signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1012. DOI: 10.3389/fphar.2018.01012.
- [8] XU Z, DAI X X, ZHANG Q Y, *et al.* Protective effects and mechanisms of *Rehmannia glutinosa* leaves total glycoside on early kidney injury in db/db mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 109926. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.109926.
- [9] OHTA T, INOHA M, KAWAHARA C, *et al.* Angiotensin I-Converting enzyme-inhibitory activity and phytochemical profile of constituents of the leaves of *Rehmannia glutinosa* f. *hueichingensis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2023, 71(7): 508. DOI: 10.1248/cpb.c22-00524.
- [10] TIAN M, LI C, AHMADD N, *et al.* Alternative strategy for purification of acteoside with hypoglycemic activity from *Rehmannia*

- glutinosa Libosch. leaves; Preparation of ZIF-8 D110 resin and its application[J]. *Ind Crop Prod*, 2023, 193: 116193. DOI: 10.1016/J.INDCROP.2022.116193.
- [11] PAN L P. Efficacy analysis of total glycosides of Rehmania leaf in patients with chronic glomerulonephritis [J]. *J Med Inf(医学信息)*, 2013, 26(30): 160.
- [12] ZHONG W X. Efficacy observation of Rehmania leaf total glycoside capsules in the treatment of proteinuria in stages 1 and 2 of chronic kidney disease [J]. *Heilongjiang J Tradit Chin Med(黑龙江中医药)*, 2017, 46(1): 64.
- [13] FAN J X. Efficacy analysis of Rehmania leaf total glycoside in chronic nephritis [J]. *Chin J Mod Drug Appl(中国现代药物应用)*, 2016, 10(16): 275.
- [14] TIAN M F. Study on the extraction, separation, and hypoglycemic activity of veronicoside from Rehmania leaf [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2022.
- [15] ZHANG Y, SHEN J, MA X, *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant activities of acteoside isolated from *Acanthus ilicifolius* var. *xiamenensis*[J]. *Appl Biol Chem*, 2022, 65(1): 1-12.
- [16] KHAN R A, HOSSAIN R, ROY P, *et al.* Anticancer effects of acteoside: mechanistic insights and therapeutic status[J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 916: 174699. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174699.
- [17] WEI W, LU M, LAN X, *et al.* Neuroprotective effect of verbasin on hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rat [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 711: 134415. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.134415.
- [18] GAO W, ZHOU Y, LI C, *et al.* Studies on the metabolism and mechanism of acteoside in treating chronic glomerulonephritis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 302: 115866. DOI: 10.1016/j.jep.2022.115866.
- [19] HAYASHI K, NAGAMATSU T, ITO M, *et al.* Acteoside, a component of *Stachys sieboldii* MIQ, may be a promising antinephritogenic; effect of acteoside on crescentic-type anti-GBM nephritis in rats[J]. *Jpn J Pharmacol*, 1994, 65(2): 143-151.
- [20] SHEN X, LI D F, ZONG G Z, *et al.* Study on the effect of total glycosides of Rehmania leaf on rabbit IgG accelerated rat nephrotoxic serum nephritis [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2010, 16(8): 179-181.
- [21] SHEN X, LI D F, ZONG G Z, *et al.* Study on the effect of total glycosides of Rehmania leaf on rat C-BSA nephritis [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2010, 16(13): 167-169.
- [22] DAI X X. Evaluation of Rehmania leaf resources and chemistry and the improvement effect and mechanism of its total glycosides on diabetic renal injury [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2018.
- [23] GU L Q, CHEN L F, XU X Z, *et al.* Toxicokinetics in preclinical safety evaluation studies [J]. *J Toxicol(毒理学杂志)*, 2018, 32(4): 332-335.
- [24] ICH, Bioanalytical method validation and study sample analysis M10[S]. 2022: 1-49.
- [25] ZHOU F, ZHAO Y, LI M, *et al.* Degradation of phenylethanoid glycosides in *Osmanthus fragrans* Lour. flowers and its effect on anti-hypoxia activity [J]. *Sci Rep-UK*, 2017, 7(1): 10068. DOI: 10.1038/s41598-017-10411-0.
- [26] HUANG J Y. Distribution in rats and *in vitro* and *in vivo* metabolism study of veronicoside [D]. Nanchang: Nanchang University, 2016.

(收稿日期:2024-08-12)