

栀子-闹羊花配伍对大鼠血浆中闹羊花毒素II和闹羊花毒素 III 的药动学影响

张小琼¹, 李婷², 王惠玉³, 刘楠⁴, 郭小红^{1*} [1.重庆市中医院药剂科, 重庆 400021; 2.重庆医科大学药学院, 重庆 400016; 3.岛津企业管理(中国)有限公司北京分公司, 北京 100020; 4.浙江康恩贝集团医疗保健品有限公司技术研发部, 浙江 兰溪 321100]

摘要: 目的 考察栀子与闹羊花配伍对闹羊花中闹羊花毒素II和闹羊花毒素 III 药动学的影响。方法 建立 LC-MS/MS 测定大鼠血浆中闹羊花毒素II和闹羊花毒素 III 的分析方法, 并用此方法测定大鼠口服给予闹羊花与栀子配伍液及闹羊花单煎液后大鼠体内的闹羊花毒素II和闹羊花毒素 III 的血药浓度, 计算其药动学参数并统计分析。结果 闹羊花毒素II在 1~200 ng·mL⁻¹、闹羊花毒素 III 在 1~100 ng·mL⁻¹ 内线性关系良好($r>0.999$), 质控样本精密度均 $<12\%$, 准确度 RSD $<20\%$ 。栀子配伍闹羊花给药和单独给药后体内闹羊花毒素II的 AUC_{0-t} 分别为(260.44±51.67)和(213.39±59.03) h·ng·mL⁻¹, 闹羊花毒素 III 的 AUC_{0-t} 分别为(60.97±22.78)和(22.38±5.55)h·ng·mL⁻¹。与闹羊花单煎给药相比, 栀子与闹羊花配伍给药后闹羊花毒素II的 $T_{1/2}$ 和 MRT_(0-t) 显著升高, 闹羊花毒素 III 的 AUC_{0-t}、 $T_{1/2}$ 、 T_{max} 和 CL 显著升高。结论 栀子与闹羊花配伍给药后使闹羊花毒素 III 在大鼠体内的吸收速度和分布体积增加、消除速率降低, 闹羊花毒素II和闹羊花毒素 III 的半衰期延长, 但不影响闹羊花毒素II在大鼠体内的吸收速率。

关键词: 闹羊花; 栀子; 配伍给药; 药动学; 闹羊花毒素 III; 闹羊花毒素II

中图分类号: R969.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)24-3352-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20231377

引用本文: 张小琼, 李婷, 王惠玉, 等. 栀子-闹羊花配伍对大鼠血浆中闹羊花毒素II和闹羊花毒素 III 的药动学影响[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(24): 3352-3359.

Effect of Compatibility of Gardeniae Fructus and Rhododendri Mollis Flos on Pharmacokinetics of Rhodojaponin II and Rhodojaponin III in Rat Plasma

ZHANG Xiaoqiong¹, LI Ting², WANG Huiyu³, LIU Nan⁴, GUO Xiaohong^{1*} [1.Department of Pharmacy, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400021, China; 2.School of Pharmacy, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China; 3.Shimadzu Enterprise Management(China) Co., Ltd., Beijing Branch, Beijing 100020, China; 4.Department of Technology Research and Development, Zhejiang CONBA Pharmaceutical Co., Ltd., Lanxi 321100, China]

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of compatibility of Gardeniae Fructus and Rhododendri Mollis Flos on the pharmacokinetic behavior of rhodojaponin II and rhodojaponin III of Rhododendri Mollis Flos. **METHODS** LC-MS/MS of rhodojaponin II and rhodojaponin III in plasma of rats was developed. The method was then applied to study the blood concentrations of rhodojaponin II and rhodojaponin III in rats after oral compatibility administration of Gardeniae Fructus and Rhododendri Mollis Flos and single decoction administration of Rhododendri Mollis Flos, respectively, then their pharmacokinetic parameters were calculated and statistical analysed. **RESULTS** The calibration curve was good linearity($r>0.999$) in the range of 1–200 ng·mL⁻¹ for rhodojaponin II and 1–100 ng·mL⁻¹ for rhodojaponin III, the precision of quality control samples was less than 12% and the accuracy was less than 20%. After administration of compatibility of Gardeniae Fructus and Rhododendri Mollis Flos and Rhododendri Mollis Flos alone, the AUC_{0-t} of rhodojaponin II *in vivo* was(260.44±51.67) and (213.39±59.03)h·ng·mL⁻¹, respectively, and the AUC_{0-t} of rhodojaponin III was (60.97±22.78) and (22.38±5.55)h·ng·mL⁻¹, respectively. Compared with single decoction of Rhododendri Mollis Flos administration group, the $T_{1/2}$ and MRT_(0-t) of the rhodojaponin II were significantly increased, the AUC_{0-t}, $T_{1/2}$, T_{max} and CL of the rhodojaponin III were also significantly risen after administration of compatibility of Gardeniae Fructus and Rhododendri Mollis Flos. **CONCLUSION** After the compatibility of Gardeniae Fructus and Rhododendri Mollis Flos, the rate of absorption and the distribution volume are increased of rhodojaponin III in rats, while the elimination rate has decreased, the $T_{1/2}$ of rhodojaponin II and rhodojaponin III are extended, but don't affect the absorption rate of rhodojaponin II in rats.

KEYWORDS: Rhododendri Mollis Flos; Gardeniae Fructus; compatibility; pharmacokinetics; rhodojaponin III; rhodojaponin II

基金项目: 国家自然科学基金项目(82104398); 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2020jcyj-msxmX0568, cstc2021jcyj-msxmX0409); 重庆英才·创新创业示范团队(CQYC201903172)

作者简介: 张小琼, 女, 博士, 主管药师 E-mail: xqzhang0808@163.com *通信作者: 郭小红, 女, 博士, 主管中药师 E-mail: 472413721@qq.com

闹羊花为杜鹃花科羊躑躅 *Rhododendron molle* G. Don. 的干燥花, 首载于《神农本草经》, 曰: “主贼风在皮肤中, 淫淫痛, 温疟。恶毒, 诸痹”, 列为下品(多“有毒”)。闹羊花作为传统中药, 其祛风除湿、散瘀镇痛的功效很强, 常作为复方中的君药或臣药用于祛风除湿、散寒止痛, 其起效快、作用强, 临床多用于治疗风湿、类风湿、跌打损伤、头癣及术前麻醉等, 是药典收录的六味木香散、生发搽剂的成方制剂的原料, 具有良好的开发及应用前景^[1]。闹羊花的根、叶、花、果均可入药, 有良好的抗类风湿性关节炎的效果^[2-3], 闹羊花中的闹羊花毒素VI有较好的抗神经疼痛的效果^[4]。但闹羊花在《植物名实图考》中被称为毒草类, 在《医疗用毒性药品管理办法》中被称为毒性药品品种, 有神经毒性、肝毒性、肾毒性、心脏毒性和呼吸毒性等^[5]。由于其毒性剧烈, 安全窗较窄, 有效剂量接近中毒剂量, 导致临床中毒事件屡有发生^[1,5]。闹羊花的主要成分为二萜类、黄酮类、香豆素类、木脂素类、三萜类等, 其中二萜类成分被认为是其特异性成分, 目前共分离出 118 个二萜类成分, 二萜类成分具有双重药理活性, 是毒性成分, 也是药效成分, 毒效同源, 如闹羊花毒素、木藜芦毒素、羊躑躅素等^[6-8]。研究发现二萜类成分中的闹羊花毒素 II 有抗炎、抗肾损伤的作用^[9-10]。闹羊花毒素 III 与闹羊花毒素 II 结构上仅相差一个乙酰氧基, 研究发现闹羊花毒素 III 能影响细胞增殖凋亡及炎症因子等的变化, 从而发挥治疗类风湿性关节炎的作用^[11]。可见, 二萜类成分闹羊花毒素 II 与闹羊花毒素 III 是闹羊花的毒性成分, 也是药效成分, 具有抗炎、镇痛、降血压等药理活性, 亦有神经、肝肾、呼吸系统等毒性^[5,12]。

如何降低闹羊花毒性, 保证临床用药安全、有效是亟待解决的关键问题。早在《神农本草经》就载有“梔子可解闹羊花毒”, 后诸多本草相关著作有相同或相似记载, 民间也常用梔子解闹羊花中毒^[13]。有研究表明, 梔子配伍闹羊花可降低急性心脏毒性及减轻慢性肝损伤, 证实梔子配伍闹羊花可达减毒之功^[14-15]。然而, 对于梔子配伍闹羊花减毒的机制尚不清楚。本研究尝试建立灵敏、简便的 LC-MS/MS 同时分析大鼠血浆中的闹羊花毒素 II 和闹羊花毒素 III, 并用于研究大鼠口服给予闹羊花水煎液、梔子配伍闹羊花合煎液后 2 种二萜类成分的药动学变化, 进而为深入研究梔子与

闹羊花配伍的科学性和合理性提供参考。

1 材料

1.1 仪器

R550IE 小动物麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司); LCMS-8045 串联质谱仪(日本岛津公司); 配 CBM-40 系统控制器, LabSolutions Ver. 5.118 色谱工作站; Shim-pack GIST C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2 μm)[岛津(上海)实验器材有限公司]XS205 十万分之一天平(美国 Mettler Toledo 公司); Rotina 380/380R 高速冷冻离心机(德国 Hettich)。

1.2 药品与试剂

闹羊花(四川欣康中药饮片有限公司, 批号: 211201)为杜鹃花科羊躑躅 *Rhododendron molle* G. Don. 的干燥花; 梔子(重庆中药饮片厂有限公司, 批号: 200560226)为茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实, 均由重庆市中医院药剂科陈玲副主任中药师鉴定; 闹羊花毒素 II(批号: 11983-201601; 纯度: 99.8%)、闹羊花毒素 III(批号: 11984-201601; 纯度: 94.7%)对照品均购自中国食品药品检定研究院; 雷公藤甲素(批号: C11375061)对照品采购自上海麦克林生化科技有限公司, 纯度≥98%; 甲醇(色谱纯, 上海安谱实验科技股份有限公司); 异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司, 批号: 21092501); 羧甲基纤维素钠(CMC-Na, 成都科龙化工试剂厂, 批号: 2014052901); 水(实验室一级水)。

1.3 动物

雄性 SD 大鼠 12 只, 体质量(180±20)g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(湘)2019-0004。动物使用许可证号: SYXK(渝)2020-0001。所有动物均自由饮水, 饲养于温度为 20~24 °C, 相对湿度为 40%~70% 的 SPF 级环境中。动物实验规程经重庆市中医院动物实验伦理委员会批准, 批准号: 2022-DWSY-ZXQ。

2 方法

2.1 标准曲线和质控储备液的配制

分别精密称取闹羊花毒素 II 和闹羊花毒素 III 对照品, 加甲醇溶解, 分别制成闹羊花毒素 II 和闹羊花毒素 III 质量浓度均为 0.5 mg·mL⁻¹ 的储备液, 用甲醇稀释成系列对照品溶液供分析用。精密称取雷公藤甲素对照品, 甲醇溶解, 制成雷公藤甲素质量浓度为 0.5 mg·mL⁻¹ 的储备液作内标

用, 置冰箱-20 °C保存, 备用。

2.2 灌胃药液的配制

闹羊花煎液的配制: 称取闹羊花 30 g, 加入 8 倍量的 80%乙醇浸泡 30 min, 然后 60 °C下煎煮 1 h 提取煎液, 趁热过滤; 第 2 次煎煮加入 5 倍量的 80%乙醇, 煎煮 1 h 后趁热过滤提取煎液, 合并 2 次滤液, 减压回收乙醇, 再用 0.5%CMC-Na 复溶样品。

栀子-闹羊花配伍煎液的配制: 分别称取闹羊花 30 g 和栀子 45 g, 用 8 倍量的 80%乙醇浸泡 30 min, 然后 60 °C煎煮 1 h 提取煎液, 3 层纱布过滤; 第 2 次煎煮加入 5 倍量的 80%乙醇, 煎煮 1 h 后纱布过滤提取煎液, 合并 2 次滤液, 减压回收乙醇, 再用 0.5%CMC-Na 复溶样品。

以闹羊花单煎液中闹羊花毒素 II 和闹羊花毒素 III 的含量为准, 用 0.5%CMC-Na 调整 2 种药液的闹羊花毒素 II 和闹羊花毒素 III 的百分含量分别为 0.14%和 0.07%。

2.3 LC-MS/MS 条件

色谱柱: Shim-pack GIST C₁₈(100 mm×2.1 mm, 2 μm); 柱温: 40 °C; 进样量: 10 μL; 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 流动相为水溶液(A)-甲醇(B), 梯度洗脱(0~3.0 min, 10%→55%B; 3.0~4.0 min, 55%B; 4.0~6.0 min, 55%→80%B; 6.0~7.0 min, 80%→90%B; 7.0~8.0 min, 90%B; 8.0~8.1 min, 90%→10%B; 8.1~13.0 min, 10%B)。

质谱测定条件: 电喷雾离子源(ESI); 扫描方式: 负离子扫描; 检测方式: 多反应监测(MRM); 加热模块温度: 400 °C; 加热气流速: 空气 10.0 L·min⁻¹, 接口温度: 300 °C; 雾化气流速: 氮气 3.0 L·min⁻¹, 脱溶剂管温度: 250 °C; 干燥气流速: 氮气 10.0 L·min⁻¹, 接口电压: -4 kV。相关的 MRM 参数见表 1。

表 1 化合物的质谱分析参数

Tab. 1 Mass spectrum analysis parameters of compounds

化合物名称	前体离子	产物离子	第一重四级杆偏转电压/V	碰撞能量/eV	第三重四级杆偏转电压/V
闹羊花毒素 II	409.3	367.2*	15.0	15.0	17.0
		331.1	15.0	30.0	23.0
闹羊花毒素 III	367.2	331.1*	18.0	20.0	22.0
		295.2	18.0	22.0	21.0
雷公藤甲素 (内标)	359.1	240.9	25.0	16.0	10.0
		283.0	26.0	17.0	20.0

注: *表示定量离子。

Note: * represented ion for quantification.

2.4 血浆样本收集

健康 SD 大鼠 12 只, ♂, 随机分为 2 组(闹羊

花单煎组和栀子-闹羊花配伍组)。给药前 12 h 禁食不禁水, 采取口服灌胃给药, 给药剂量为闹羊花单煎组 2.1 g·kg⁻¹(以闹羊花生药计), 栀子-闹羊花配伍组为 2.1 g·kg⁻¹(以闹羊花生药计)。动物眼眶静脉丛采集全血(约 0.4 mL)用于药动学分析。动物采血时间点: 给药前及给药后 10, 30 min, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h。血样置肝素钠离心管中, 在冰浴条件下转运, 取血后 1 h 内 9 600×g 离心 5 min, 分取上层血浆, 于-80 °C中保存待测。

2.5 血浆样品处理

取大鼠血浆 50 μL 于 1.5 mL EP 管中, 准确加入 150 μL 用甲醇稀释配制的雷公藤甲素(300 ng·mL⁻¹)内标标准中间液, 涡旋混匀 1 min, 置于超声机中水浴超声提取 30 min, 取出后放入 4 °C 冷冻离心机中, 9 600×g 离心 5 min 后取出, 过 0.22 μm 有机滤膜至内插管中, 进样 LC-MS/MS 分析。

2.6 方法学考察

2.6.1 专属性考察 取大鼠空白血浆, 分别配制空白血浆加内标、空白血浆加对照品(闹羊花毒素 II 和闹羊花毒素 III)和内标、给药后的血浆样品加内标、空白血浆加 1 ng·mL⁻¹的对照品(闹羊花毒素 II 和闹羊花毒素 III)和内标^[16], 其余按“2.5”项下方法操作, 上机进样获得相应色谱图。

2.6.2 标准曲线与线性范围 取大鼠空白血浆 50 μL, 准确加入不同浓度的闹羊花毒素 II 和闹羊花毒素 III 对照品溶液 10 μL, 配制成不同浓度的血浆样本, 稀释成闹羊花毒素 III 的质量浓度分别为 1, 2, 5, 10, 25, 50, 75, 100 ng·mL⁻¹, 闹羊花毒素 II 质量浓度分别为 1, 2, 10, 25, 50, 75, 150, 200 ng·mL⁻¹ 的对照品溶液, 再按“2.5”项下方法操作。以血浆中待测物浓度为横坐标(x), 待测物与内标的峰面积比值为纵坐标(y), 用加权(W=1/x²)最小二乘法进行回归运算, 求得的直线回归方程, 即为标准曲线。

2.6.3 提取回收率和基质效应 取大鼠空白血浆 50 μL, 按“2.6.2”项下方法操作分别配制最低检测限(1 ng·mL⁻¹)和高、中、低 3 个浓度(闹羊花毒素 III 的质量浓度分别为 3, 50, 80 ng·mL⁻¹; 闹羊花毒素 II 的质量浓度分别为 3, 100, 160 ng·mL⁻¹)的质量控制(quality control, QC)样品, 进行 LC-MS/MS 分析, 每一个浓度进行 6 样本分析, 得峰面积 A; 另取空白血浆 50 μL, 除不加混合对照品溶液外, 其余按“2.5”项下方法操作, 再向获得的上清液中加入相应高、中、低 3 个浓度的混合对照品溶液和内标, 涡旋混匀后进行 LC-MS/

MS 分析, 得峰面积 B , 每一个浓度进行 6 样本分析; 另取上述高、中、低浓度的 QC 溶液与内标, 涡旋混匀后进行 LC-MS/MS 分析, 进样得峰面积 C 。以 $B/C \times 100\%$ 计算基质效应, $A/B \times 100\%$ 计算提取回收率。

2.6.4 高、中、低 3 个浓度的准确度和精密度 按“2.6.3”项下方法分别配制含高、中、低 3 个浓度的闹羊花毒素 II 和闹羊花毒素 III 的大鼠血浆 QC 样品, 每一个浓度进行 6 样本分析, 日内连续进样, 并与标准曲线同时进行。测定 3 批, 分别计算各物质的浓度, 求算日间精密度。

2.6.5 稳定性考察 取 QC 样品, 按“2.5”项下方法处理, 分别考察血浆样本室温(25 °C)放置约 4 h、在自动进样器(4 °C)内放置 24 h、反复冻融 3 次的稳定性, 每一浓度平行进行 6 样本分析, 用测定的每组 QC 样品浓度均值减去其标示浓度, 再

计算相对误差(relative error, RE)。

2.7 药动学试验

按“2.4”项下方法采集血浆样品, 再按“2.5”项下方法处理样品。每批次生物样品测定随行标准曲线, 根据每一分析批的标准曲线计算未知样品的浓度。

2.8 数据处理

采用 WinNonlin Professional v8.1(Certara, USA)软件中的非房室模型分析方法拟合各药动学参数, 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。相关统计用 Graphpad 9.0 软件分别进行独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 专属性考察 取大鼠空白血浆+内标、空白血浆+对照品+内标及给药后血浆样品+内标, 按

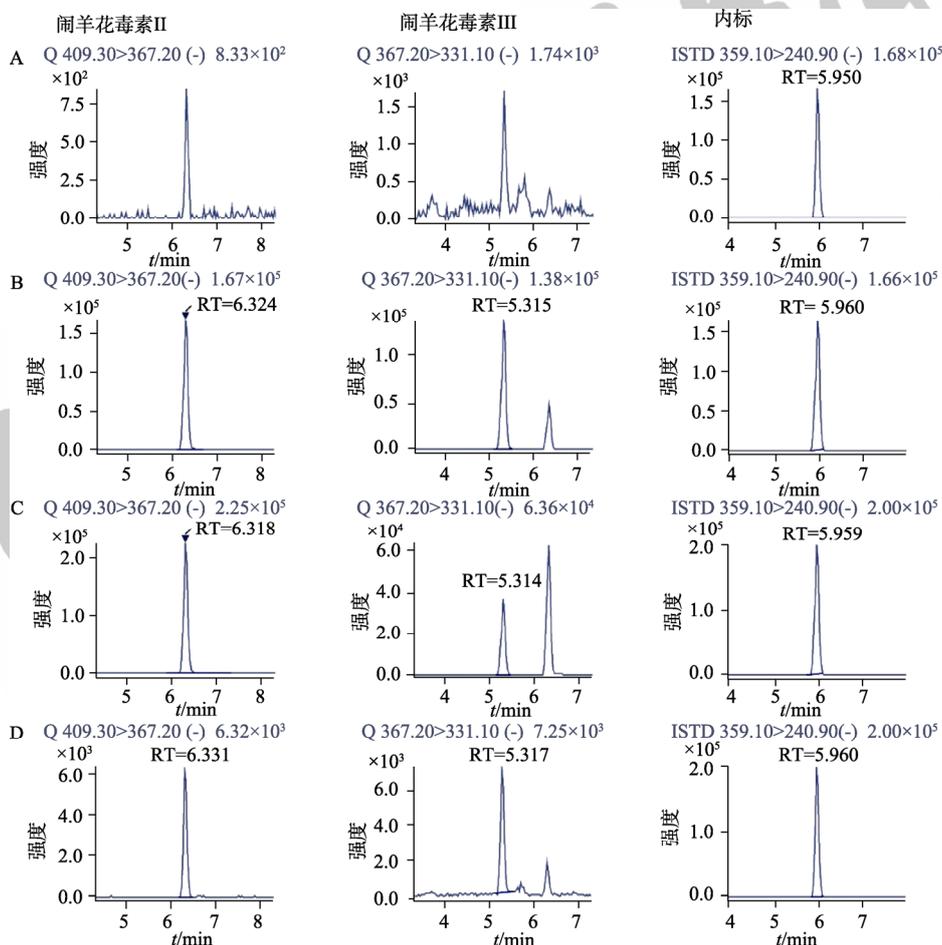


图 1 闹羊花毒素 II 和闹羊花毒素 III 色谱图

A-空白血浆+内标; B-空白血浆+对照品+内标; C-配伍给药后 1.5 h 的含药血浆+内标; D-空白血浆+最低检测限对对照品(闹羊花毒素 II 和闹羊花毒素 III 均为 1 ng·mL⁻¹)。

Fig. 1 Chromatograms of rhodojaponin II and rhodojaponin III

A-blank plasma+internal standard; B-blank plasma+standard substance+internal standard; C-drug containing plasma 1.5 h after compatibility administration+internal standard; D-blank plasma+LLOQ concentration of reference substance (the concentration of rhodojaponin II and rhodojaponin III was 1 ng·mL⁻¹).

“2.5”项下方法处理后进样,获得相应的色谱图,见图1。结果表明,大鼠空白血浆中的内源性物质不干扰闹羊花毒素II和闹羊花毒素III的测定,提示该方法的专属性良好。

3.1.2 线性关系考察 用闹羊花毒素II和闹羊花毒素III的终浓度作为横坐标(x),测定并计算闹羊花毒素II和闹羊花毒素III的峰面积与内标雷公藤甲素峰面积比值作为纵坐标(y),结果表明,这2种化合物中闹羊花毒素II在1~200 ng·mL⁻¹,闹羊花毒素III在1~100 ng·mL⁻¹的线性关系良好。线性回归方程和相关系数见表2。

表2 闹羊花毒素III和闹羊花毒素II在大鼠血浆中的线性范围、线性回归方程、相关系数

Tab. 2 Results of linear range, linear regression equation and correlation coefficient of rhodojaponin III and rhodojaponin II in rat plasma

目标化合物	保留时间/min	线性范围/ng·mL ⁻¹	线性回归方程	相关系数r
闹羊花毒素III	5.3	1~100	y=8.669 253x+0.007 569 361	0.999 9
闹羊花毒素II	6.3	1~200	y=10.724 90x-0.005 015 811	0.999 6

3.1.3 提取回收率和基质效应 取大鼠空白血浆50 μL,按“2.6.3”项下方法处理分析样品,进样测定。结果表明,定量下限闹羊花毒素III和闹羊花毒素II(均为1 ng·mL⁻¹)的回收率分别为(90.58±4.15)%和(90.89±3.67)%,3个浓度的质控样品和内标平均提取回收率在90.29%~102.52%,RSD≤7.45%;定量下限闹羊花毒素III和闹羊花毒素II(均为1 ng·mL⁻¹)的基质效应分别为(100.13±1.37)%和(100.10±0.95)%,3个浓度质控样品的平均基质效应在97.93%~101.22%,RSD≤3.55%,均符合血浆样品分析要求。结果见表3。

3.1.4 准确度和精密度试验 取空白血浆50 μL,

按“2.5”项下方法处理,配制闹羊花毒素III和闹羊花毒素II的低、中、高3个质量浓度的含药血浆样品溶液,按“2.6.4”项下方法分析样品,进样测定其日内、日间精密度和准确度。低、中和高浓度质控样品的日内和日间精密度RSD均<12%,准确度RSD<20%,表明所建方法符合生物样品分析的需求。结果见表4。

3.1.5 稳定性试验 取50 μL空白血浆,按“2.6.5”项下方法处理,配制好血浆样品溶液,分别在室温放置4 h、在自动进样器内(4℃)放置24 h、于-20℃冰箱中保存14 d解冻及样品3次冻融循环,进样分析,考察不同条件下样品的稳定性。结果表明,血浆样品中闹羊花毒素III的测定浓度与理论浓度的RE为-6.33%~9.83%,闹羊花毒素II的测定浓度与理论浓度的RE为-7.83%~8.83%,均在±10.00%以内,表明在上述条件下样品基本稳定,以上各条件不影响对样品浓度进行准确测定。

3.2 药动学结果

SD大鼠分别灌胃给予闹羊花单煎液、栀子-闹羊花配伍液后,其主要代谢产物闹羊花毒素III及闹羊花毒素II的药物浓度-时间曲线见图2。经WinNonlin软件分析,计算出闹羊花毒素III及闹羊花毒素II的药动学参数,再利用Graphpad 9.0软件对2组血浆中闹羊花毒素III及闹羊花毒素II的药动学参数分别进行独立样本t检验,结果见表5。大鼠灌胃给予闹羊花单煎液和栀子-闹羊花配伍合煎液后,栀子-闹羊花配伍组给药后的闹羊花毒素III较闹羊花单煎组的AUC_(0-t)、T_{max}和T_{1/2}显著增高(P<0.05),CL显著降低(P<0.05),但C_{max}、MRT_(0-t)和V_z差异无统计学意义,栀子-闹羊花配伍给药后体内的闹羊花毒素II仅T_{1/2}和MRT_(0-t)较单煎组显著增高(P<0.05)。

表3 闹羊花毒素III和闹羊花毒素II在大鼠血浆中的回收率和基质效应结果(n=6)

Tab. 3 Results of recovery rate and matrix effect for the determination of rhodojaponin III and rhodojaponin II in rat plasma(n=6)

目标化合物	理论浓度/ng·mL ⁻¹	回收率/%		基质效应/%	
		$\bar{x} \pm s$	RSD	$\bar{x} \pm s$	RSD
闹羊花毒素III	1	90.58±4.15	4.58	100.13±1.37	1.37
	3	90.29±6.73	7.45	101.22±1.12	1.11
	50	93.25±6.40	6.87	99.49±2.12	2.13
	80	90.67±5.46	6.02	99.36±1.48	1.49
闹羊花毒素II	1	90.89±3.67	4.03	100.10±0.95	0.95
	3	90.45±1.84	2.04	99.93±1.62	1.62
	100	92.74±7.33	7.90	98.86±3.51	3.55
	160	93.33±4.49	4.81	97.93±1.78	1.81
雷公藤甲素	300	102.52±1.64	1.60	100.23±0.99	0.99

表 4 闹羊花毒素 III 和闹羊花毒素 II 在大鼠血浆中的日内、日间精密度和准确度结果(n=6)

Tab. 4 Results of intra-day and inter-day precision and accuracy for the determination of rhodojaponin III and rhodojaponin II in rat plasma(n=6)

目标化合物	理论浓度/ ng·mL ⁻¹	日内精密度		日间精密度		准确度	
		实测浓度/ ng·mL ⁻¹	RSD/%	实测浓度/ ng·mL ⁻¹	RSD/%	实测浓度/ ng·mL ⁻¹	RSD/%
闹羊花毒素 III	3	3.04±0.26	8.4	3.09±0.32	10.3	3.07±0.23	7.5
	50	50.52±2.69	5.3	50.90±4.27	8.4	50.25±3.73	7.4
	80	80.33±4.49	5.6	79.16±6.04	7.6	80.48±5.03	6.3
闹羊花毒素 II	3	2.97±0.29	9.8	3.01±0.25	8.4	3.05±0.27	8.7
	100	100.37±6.49	6.5	100.54±5.70	5.7	100.41±4.49	4.5
	160	160.11±8.73	5.5	160.03±9.85	6.2	160.56±5.04	3.1

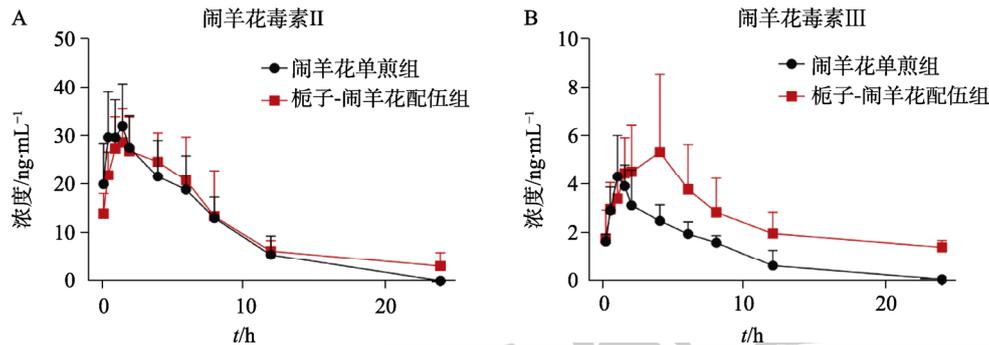


图 2 大鼠分别灌胃给予闹羊花和栀子-闹羊花配伍药物后体内闹羊花毒素 II(A)及闹羊花毒素 III(B)的药时曲线

Fig. 2 Mean plasma concentration-time graph of rhodojaponin II(A) and rhodojaponin III(B) in rats after oral administration of Rhododendri Mollis Flos and Rhododendri Mollis Flos-Gardeniae Fructus, respectively

表 5 大鼠分别灌胃给予闹羊花和栀子-闹羊花配伍药物后体内闹羊花毒素 II 及闹羊花毒素 III 的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 5 Pharmacokinetic parameters of rhodojaponin II and rhodojaponin III in rats after oral administration of Rhododendri Mollis Flos and Rhododendri Mollis Flos-Gardeniae Fructus($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	闹羊花毒素 II		闹羊花毒素 III	
	闹羊花单煎组	栀子-闹羊花配伍组	闹羊花单煎组	栀子-闹羊花配伍组
AUC _(0-∞) /h·ng·mL ⁻¹	251.32±85.05	316.56±81.44	40.47±13.25	101.69±21.75
AUC _(0-t) /h·ng·mL ⁻¹	213.39±59.03	260.44±51.67	22.38±5.55	60.97±22.78 ¹⁾
T _{1/2} /h	3.88±1.70	8.08±6.33 ¹⁾	8.65±4.03	21.72±14.64 ¹⁾
T _{max} /h	1.17±0.61	1.50±0.32	1.33±0.41	2.83±1.29 ¹⁾
C _{max} /ng·mL ⁻¹	34.27±9.17	29.36±6.39	4.91±1.40	5.62±2.96
MRT _(0-∞) /h	4.46±0.27	6.85±1.84 ¹⁾	4.14±0.75	9.35±1.07
Vz/L·kg ⁻¹	48 721.77±18 876.08	71 869.30±39048.07	633 384.85±224 369.35	590 350.49±298 554.63
CL/L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	9 071.18±2 612.86	6 789.01±1559.39	55 179.52±14 094.94	20 411.16±3 969.02 ¹⁾

注: 与闹羊花单煎组比较, ¹⁾P<0.05。

Note: Compared with Rhododendri Mollis Flos single decoction group, ¹⁾P<0.05.

4 讨论

本实验建立了一种快速、灵敏、可靠的 LC-MS/MS 用于同时测定大鼠血浆中闹羊花毒素 II 及闹羊花毒素 III 的方法。该方法样品制备过程简单迅速、检测时间短, 具有高选择性、高精密度、高准确度和良好的稳定性, 可用于灌胃给药闹羊花单煎液及与栀子配伍给药的药动学研究, 为进一步深入研究提供了依据。

文献报道闹羊花毒素 II 和闹羊花毒素 III 均属于闹羊花的主要毒效成分, 闹羊花毒素 II 和闹羊花毒素 III 均有镇痛抗炎, 降血压等作用^[5], 且不同产地闹羊花药材中闹羊花毒素 II 和闹羊花毒素 III 的含量较为稳定, 而同为二萜类成分的闹羊花毒素 V 含量差异较大^[17]。本研究在灌胃给予闹羊花单煎液及栀子-闹羊花配伍煎液后的大鼠体内均未检测到闹羊花毒素 V, 但在原药物的煎液中检

测到闹羊花毒素 V(含量为 0.01%), 均低于闹羊花毒素 II(0.14%)和闹羊花毒素 III(0.07%), 提示闹羊花毒素 V 虽然也是二萜类成分, 但进入体循环的量远低于同为二萜类成分的闹羊花毒素 II 和闹羊花毒素 III, 再一次印证了闹羊花毒素 II 和闹羊花毒素 III 可能是闹羊花主要的毒效成分。

梔子-闹羊花配伍组给药后的闹羊花毒素 III 较闹羊花单煎组的 $AUC_{(0-t)}$ 、 T_{max} 和 $T_{1/2}$ 明显增高, CL 显著降低, 但 C_{max} 、 $MRT_{(0-t)}$ 和 V_z 差异无统计学意义, 提示闹羊花毒素 III 在大鼠体内的 AUC 增加, 但是 C_{max} 并未增加, 利于减毒存效, 与前期实验发现的闹羊花配伍梔子给药(LD_{50} 为 $4.51 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)的小鼠急性毒性小于闹羊花单煎液给药(LD_{50} 为 $4.09 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)一致(相关论文尚未发表)。梔子-闹羊花配伍给药后体内的闹羊花毒素 II 仅 $T_{1/2}$ 和 $MRT_{(0-t)}$ 较闹羊花单煎组显著增高, 但总体的 AUC 变化不具有统计学意义, 结果提示闹羊花配伍梔子给药减毒存效的物质基础主要与闹羊花毒素 III 的体内吸收增加且 C_{max} 无明显变化有关。文献^[18]报道闹羊花毒素 III 灌胃给予小鼠后的口服生物利用度为 73.6%, T_{max} 为 0.08 h, 本研究发现闹羊花配伍梔子给药后体内的闹羊花毒素 III 的 T_{max} 显著后延, 但是 $T_{1/2}$ 也延长, 闹羊花与梔子配伍给药后大鼠体内闹羊花毒素 III 的 AUC_{0-t} 明显增加, 为闹羊花配伍梔子减毒存效提供一定依据。但鉴于文献报道的闹羊花毒素 III 给药后 0.08~4 h 内主要分布在肾、肺、心脏、脾和胸腺, 其中在肾中的浓度一直最高, 但在肝中的浓度一直较低, 总体上闹羊花毒素 III 在大鼠体内的消除较快, 且在血液中的浓度与组织中浓度不具明显差异的特点, 提示闹羊花毒素 III 主要经肝肾排泄且其不易在组织内蓄积^[18], 而本研究发现配伍给药后闹羊花毒素 III 在体内的 CL 较单煎组明显降低, 提示后续研究中需进一步关注肝肾功能不全对梔子配伍闹羊花给药后闹羊花毒素 III 在体内的消除速度的影响。

文献报道闹羊花毒素 II 经抑制 TGF- β 1/Smad 信号通路实现其抗炎作用^[9], 本研究发现, 与闹羊花单煎液给药相比, 梔子-闹羊花配伍给药后闹羊花毒素 II 的 $T_{1/2}$ 、 $MRT_{(0-t)}$ 明显升高, 但 C_{max} 、 $AUC_{(0-t)}$ 无明显变化, 提示配伍给药后闹羊花毒素 II 半衰期延长可能与其在体内的驻留时间延长相关, 但其吸收程度无明显变化; 配伍给药后闹羊花毒素 II 在体内的达峰浓度无明显变化有利于其在安全浓度

范围内持续地发挥药效。本研究中, 配伍给药后闹羊花毒素 III 的 AUC_{0-t} 显著升高提示其在大鼠体内的吸收增加; 配伍给药后闹羊花毒素 III 的 T_{max} 显著升高提示其在大鼠体内的吸收速度减慢; 配伍给药后闹羊花毒素 III 的 $T_{1/2}$ 显著升高但 CL 显著降低, 提示闹羊花毒素 III 在大鼠体内的吸收增加可能与其消除减慢相关, 与其在体内的 $T_{1/2}$ 延长相关。总之, 梔子-闹羊花配伍给药能影响闹羊花毒素 II 和闹羊花毒素 III 在大鼠体内的药动学特征。本研究结果可为下一步深入研究闹羊花与梔子配伍的科学性和合理性提供参考价值。

REFERENCES

- [1] LIU A L, ZHANG L, DU G H. The historical cognition and evaluation of *Rhododendron molle* toxicity[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*(中药药理与临床), 2018, 34(5): 161-163.
- [2] HE Y C, YAO Y M, XUE Q W, et al. Anti-rheumatoid arthritis potential of diterpenoid fraction derived from *Rhododendron molle* fruits[J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(3): 181-187.
- [3] LUO Y Q, SHEN Y, ZONG L Y, et al. Anti-rheumatoid arthritis potential of *Rhododendron molle* G. Don leaf extract in adjuvant induced arthritis rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023(307): 116175.
- [4] CHEN K L, WANG T, LI Y, et al. Rhodojaponin VI indirectly targets Cav2.2 channels via N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein to alleviate neuropathic pain[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(3): 1326-1336.
- [5] GUO X H, FENG J W, YOU Q, et al. Research progress on poisonous Chinese medicine of *Rhododendri Mollis* Flos[J]. *China Pharm*(中国药业), 2020, 29(23): 96-104.
- [6] LI C H, ZHANG J Y, ZHANG X Y, et al. An overview of grayanane diterpenoids and their biological activities from the Ericaceae family in the last seven years[J]. *Eur J Med Chem*, 2019(166): 400-416.
- [7] ZOU H Y, LUO J, XU D R, et al. Tandem solid-phase extraction followed by HPLC-ESI/QTOF/MS/MS for rapid screening and structural identification of trace diterpenoids in flowers of *Rhododendron molle*[J]. *Phytochem Anal*, 2014, 25(3): 255-265.
- [8] CAI Y Q, HU J H, QIN J, et al. *Rhododendron molle* (Ericaceae): Phytochemistry, pharmacology, and toxicology[J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16(6): 401-410.
- [9] QIU Y, ZHOU J F, ZHANG H Q, et al. Rhodojaponin II attenuates kidney injury by regulating TGF- β 1/Smad pathway in mice with adriamycin nephropathy[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019(243): 112078.
- [10] KONG L L, WANG L F, ZHAO Q, et al. Rhodojaponin II inhibits TNF- α -induced inflammatory cytokine secretion in MH7A human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, 34(10): e22551.
- [11] LIU X R, LIU X D, WANG Z, et al. Effect of rhodopsin III

on proliferation and apoptosis of fibroblast-like synovial cells by regulating Wnt1/Dvl1/ β -catenin pathway[J]. Chin J Integr Tradit West Med(中国中西医结合杂志), 2022, 42(10): 1199-1206.

[12] XUE Q W, LIANG S. Research progress on chemical constituents of *Rhododendron molle* and its pharmacological activities[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2020, 51(5): 1350-1360.

[13] 蔡邦镇. 栀子治疗羊蹄躅中毒的报导[J]. 四川中医, 1983(4): 56.

[14] 姚敏, 金柳燕, 代文月, 等. 栀子对闹羊花肝毒性的解毒效应的动物实验研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(9): 2183-2185.

[15] YAO M, DAI W Y, JIN L Y, et al. Animal experimental study of detoxication effect in Fructus Gardeniae to acute toxicity of Flos Rhododendri Mollis[J]. J Emerg Tradit Chin Med(中国中

医急诊), 2011, 20(11): 1777-1779.

[16] ZHENG Y L, WANG X Y, XU X Y, et al. Characterization, *in vitro* release and pharmacokinetics of paclitaxel-loaded PEGylated carboxymethyl chiosan-rhein conjugate micelles[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2023, 40(7): 865-872.

[17] FENG J W, GUO X H, ZHANG Y, et al. GC-IMS analysis of volatile components in *Rhododendri Mollis* Flos at different flowering stages[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2021, 27(10): 85-92.

[18] ZHANG J Q, ZHAO C C, YANG Q Y, et al. Pharmacokinetics, bioavailability and tissue distribution studies of rhodojaponin III in mice using QTRAP LC-MS/MS[J]. Biomed Chromatogr, 2019, 33(11): e4649.

收稿日期: 2023-05-19

(本文责编: 陈怡心)

本刊 2023 年度特邀审稿专家名单

本刊 2023 年度特邀以下专家 210 名(以姓名拼音为序)审定稿件。各位审稿专家以严谨的科学作风、高超的学术造诣、对作者负责的高尚精神认真审稿, 并提出修改意见, 保证和提高了杂志的质量。编辑部全体同仁并代表广大作者、读者, 在此表示衷心的感谢!

蔡 圣	蔡鑫君	蔡 宇	曹 戟	陈丹菲	陈桂良	陈红梅	陈宏降	陈枢青	陈素红
陈永正	陈云雨	程国华	程科军	戴海斌	翟科峰	董庆利	董作军	杜文婷	方 罗
方伟杰	冯 瑛	冯 震	傅 力	傅旭春	甘礼社	高建青	高丽娟	葛卫红	龚行楚
郭建军	郭建明	郭瑞臣	郭 勇	韩 博	韩 钢	韩 旻	韩 奇	何 昱	侯旭奔
胡巧红	胡 英	黄永焯	黄 真	纪志梁	贾 飞	简瞰昱	江 波	姜赛平	姜昕鹏
蒋 程	蒋剑平	蒋利和	金银秀	雷珊珊	李 波	李 勃	李范珠	李 飞	李功华
李清林	李绍平	李文龙	李 新	李新刚	李迎迎	梁 广	梁文权	刘 斌	刘 睿
楼 燕	陆国红	罗文华	骆松梅	骆 翔	马忠俊	毛根祥	毛培江	苗明三	缪 静
倪韶青	潘 杰	裴宇盛	彭丽华	彭 昕	秦路平	邱利焱	阮 昊	邵加安	申屠建中
盛 荣	施 菁	史天陆	寿 旦	帅 棋	宋沁馨	孙德清	孙慧涌	孙世光	孙晓译
覃骊兰	谭亲友	汤晓玲	唐 静	唐 莲	王 翀	王海钠	王 建	王建平	王金朝
王娜妮	王启钦	王 俏	王溶溶	王伟影	王晓颖	王新财	王泽民	王 增	王长连
王知坚	王志安	魏 炜	魏晓红	翁勤洁	吴 斌 ¹	吴 斌 ²	吴佳莹	吴嘉琪	吴耀东
吴永江	向 铮	谢 诚	谢升谷	谢升阳	辛传伟	辛洪亮	熊 山	熊 阳	徐全华
徐云根	许东航	宣自学	颜春鲁	燕 茹	羊红玉	杨 波 ¹	杨 波 ³	杨 峰	杨继鸿
杨建宏	杨江丰	杨 科	杨明华	杨伟峰	杨振中	姚建标	叶益萍	应美丹	应晓英
应 雪	应 茵	余露山	俞振伟	袁 弘	原永芳	曾克武	曾 苏	曾 璇	詹金彪
张 博	张 翀	张得钧	张建永	张剑萍	张军民	张立将	张水利	张翔南	张信岳
张 耀	张轶雯	张志清	张尊建	章超凡	赵 晨	赵华军	赵梦丹	赵瑞芝	赵维良
赵永星	郑 斌	郑彩虹	郑高利	郑小玲	郑 英	周 华	周建良	周 萍	周 权
周双艳	周 展	周长新	朱 峰	朱 虹	朱建国	朱 炯	朱全红	朱婉萍	朱余兵

注: ¹单位为浙江大学; ²单位为上海交通大学医学院附属仁济医院; ³单位为浙江中医药大学。