

# 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

黎娜<sup>a,c</sup>, 杨淑婷<sup>a,c</sup>, 陆苑<sup>a</sup>, 巩仔鹏<sup>a</sup>, 李勇军<sup>b</sup>, 曹闯<sup>c</sup>, 王永林<sup>a\*</sup> (贵州医科大学, a. 贵州省药物制剂重点实验室, 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室; b. 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心; c. 药学院, 贵阳 550004)

**摘要:**目的 建立 UPLC-MS/MS 分析方法,同时测定羊耳菊提取物中 7 种成分在 SD 大鼠尿液中的含量,并对其在大鼠尿液中的排泄进行研究。方法 大鼠灌胃羊耳菊提取物后,分别收集给药后 0~2、2~6、6~12、12~24、24~36 h 时间段的尿液。色谱柱采用 Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 柱温 45 ℃, 0.1% 甲酸乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.25 mL·min<sup>-1</sup>。质谱采用电喷雾离子源 (ESI), 正负离子扫描, 多反应离子监测 (MRM) 模式进行定量。结果 7 种成分在测定浓度范围内线性关系良好 (r≥0.991 0), 日内、日间精密度 RSD < 15%, 稳定性良好, 提取回收率大于 84.41%, 不存在明显的基质效应, 符合要求。结论 UPLC-MS/MS 方法简便、快捷、灵敏度高, 可用于 SD 大鼠尿液中羊耳菊提取物 7 种成分的含量测定。大鼠尿液排泄结果显示, 7 种成分在尿液中的原型排泄率均较低, 累积排泄率不足 5%。

**关键词:**超高效液相色谱质谱联用; 羊耳菊; 含量测定; 尿液排泄

doi:10.11669/cpj.2019.21.014 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)21-1797-07

## Investigation of the Excretion of Seven Constituents of *Inula cappaort* in Rat Urine by UPLC-MS/MS

LI Na<sup>a,c</sup>, YANG Shu-ting<sup>a,c</sup>, LU Yuan<sup>a</sup>, GONG Zi-peng<sup>a</sup>, LI Yong-jun<sup>b</sup>, CAO Chuang<sup>c</sup>, WANG Yong-lin<sup>a\*</sup> (a. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics; b. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education); c. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish an UPLC-MS/MS method for the analysis of seven compounds of *Inula cappaort* in rat urine to study their excretion. **METHODS** The urine samples in 0-2, 2-6, 6-12, 12-24, and 24-36 h were collected. Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) was used and the column temperature was set at 45 ℃, the mobile phase was 0.1% formic acid acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution in a gradient elution mode and flow rate was 0.25 mL·min<sup>-1</sup>. The detection was carried out by a triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer in positive and negative ion mode with an electrospray source. Multiple reactions monitoring (MRM) mode was employed. **RESULTS** The calibration curves showed good linearity, with correlation coefficients of greater than 0.991 0 for all of the analytes within the concentration ranges. The intra-day and inter-day precisions (RSD) were all less than 15%. The extraction recoveries of the seven components were more than 84.41%, without obvious matrix effect, which met the requirements for analysis. **CONCLUSION** The established method is simple, rapid, and sensitive. It can be applied in the excretion study of the seven components of *Inula cappaort* extract in rat urine. The urine excretion test showed that the prototype excretion rates are low in rats, and the cumulative excretion rates are all less than 5%.

**KEY WORDS:** UPLC-MS/MS; *Inula cappa*; content determination; urine excretion

羊耳菊 [*Inula cappa* (Buch.-Ham. ExD. Don) DC] 又名白牛胆、山白芷、见肿消, 为菊科旋覆花属植物的新鲜或干燥全草, 具有解毒、散热、祛风痰等作用, 为贵州省少数民族常用药, 主要用于治疗咽喉肿痛、感冒发热等症状<sup>[1-3]</sup>。研究显示, 羊耳菊提取

物具有较好的抗炎及抗微生物作用, 目前以羊耳菊为主要原料药制备的双羊喉痹通颗粒、莲菊感冒胶囊及菊黄上清含片均已运用于临床<sup>[4-5]</sup>。

药物排泄过程是药物代谢动力学的重要环节, 关系着药物的治疗效果、药效维持的时间及毒副作用

**基金项目:**国家自然科学基金项目资助 (81360680, 81860734); 贵州省优秀青年科技人才培养项目资助 (黔科合人字[2015]11 号); 贵州省科技厅人才团队项目资助 (黔科合平台人才[2016]5613/5677); 贵州省高层次创新型人才培养项目资助 (百层次黔科合平台人才[2016]5677)

**作者简介:**黎娜, 女, 硕士研究生 研究方向: 中药药效物质基础与药动学研究 \* **通讯作者:**王永林, 教授, 博士生导师, 硕士生导师 研究方向: 中药药效物质基础研究 Tel: (0851) 6908899 E-mail: gywyl@gmc.edu.cn

用等<sup>[6]</sup>,吸收进入体内的药物经过水解、羟基化等系列过程生成代谢产物被排出体外,尿液排泄是药物排出体外的主要过程。尿液中药物的浓度能反映出药物吸收入血后经体循环代谢及肾脏排泄情况<sup>[7]</sup>。因此,比较不同类型化合物在尿液中的含量差异,阐明其排泄特点,对研究药物在体内的过程具有重要意义。课题组前期对羊耳菊抗炎及抗菌的活性成分进行了研究,鉴定了绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸、3,4-二咖啡酰基奎宁酸、1,3-二咖啡酰基奎宁酸、4,5-二咖啡酰基奎宁酸、木犀草苷等成分为羊耳菊的主要成分,但并未对羊耳菊中主要组分在大鼠体内的排泄情况进行研究<sup>[8-11]</sup>,因此本实验通过建立适当的 UHPLC-MS/MS 分析方法,对大鼠口服羊耳菊提取物后不同时间段尿液样品中原型成分进行定量分析,计算累积排泄量及累积排泄率,明确其在尿液中的排泄特点,为羊耳菊的深入研究提供参考依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 药物与试剂

葛根素、木犀草苷和绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110752-201514、111720-201408 和 110753-201415,纯度:95.45%、94.9% 和 99.3%);新绿原酸、隐绿原酸、1,3-二咖啡酰基奎宁酸、3,4-二咖啡酰基奎宁酸和 4,5-咖啡酰基奎宁酸(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,批号: X20-20141012、Y58-20141012、1384-101215、1384-101215 和 1384-101215,纯度均大于 98%),羊耳菊提取物(实验室自制,批号:20150316)。

### 1.2 实验仪器

超高效液相色谱-三重四级杆质谱联用仪(美国 Waters 公司);Allegra 64R 低温高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司);700 系列超低温冰箱(美国 Thermo 公司);MTN-2800D 氮吹仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);EL204 万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);EL240 十万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);超纯水机(四川沃特科技发展有限公司)。

### 1.3 实验动物

健康 SD 大鼠,体质量为  $(250 \pm 20)$  g [重庆腾鑫生物技术有限公司,合格证号:SCXK(渝)2015-0001]。在室温  $20 \sim 25$  °C,相对湿度  $(60 \pm 10)\%$  的条件下饲养,自由进食、进水。给药前禁食 12 h,自由饮水。

## 2 方法

### 2.1 溶液的配制

内标溶液的配制:精密称取葛根素 5.7 mg,置于 5 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,得质量浓度为  $1.14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的葛根素储备液。精密吸取适量储备液稀释至质量浓度为  $4.56 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的内标溶液,  $-20$  °C 贮存备用。

对照品溶液的配制:分别精密吸取 7 种对照品储备液适量,用甲醇稀释成一定浓度的混合标准溶液,其中 4,5-二咖啡酰基奎宁酸、新绿原酸、绿原酸、3,4-二咖啡酰基奎宁酸、1,3-二咖啡酰基奎宁酸、隐绿原酸和木犀草苷的质量浓度分别为 0.102、0.107、0.103、0.102、0.102、0.102 和  $0.103 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,再逐级稀释至表 1 中的系列浓度的标准溶液,上述溶液均置于  $-20$  °C 贮存备用。

羊耳菊提取物的制备:取羊耳菊干燥药材 12 kg,充分混匀,取 10 倍量体积分数 60% 乙醇,提取 3 次,每次 1 h,合并 3 次滤液,减压浓缩,回收乙醇,得 12 L 浓缩液。上述浓缩液用 D101 大孔树脂吸附(径高比 1:4),加水洗脱至流出液无颜色后,再用 60% 乙醇洗脱,收集洗脱液,去溶剂,得浸膏,微波真空干燥即得,得膏率为 7%,  $-4$  °C 条件干燥保存备用。采用 UPLC-MS/MS 对所提取的羊耳菊提取物进行含量测定分析。经测定,羊耳菊提取物中木犀草苷、1,3-二咖啡酰基奎宁酸、3,4-二咖啡酰基奎宁酸、4,5-二咖啡酰基奎宁酸、新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸的含量依次为 0.74%、2.01%、3.82%、3.56%、3.87%、2.17%、0.99% 和 3.36%<sup>[7]</sup>。

### 2.2 尿液样品采集与处理

尿液样品采集:取健康 SD 大鼠 6 只,置于代谢笼中,实验前禁食 12 h,自由饮水,并同时收集空白尿液。按生药量为  $100 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的剂量连续灌胃羊耳菊提取物的蒸馏水溶液 3 d,每天 2 次,收集末次给药后 0~2、2~6、6~12、12~24、24~36 h 时间段的尿液,并记录各时间段的尿液体积,置于  $-20$  °C 冷藏。

尿液样品处理:取大鼠尿液 300  $\mu\text{L}$ ,置于 1.5 mL 离心管中,加入 20% 甲酸水(V:V)60  $\mu\text{L}$ ,涡混,加入内标溶液 20  $\mu\text{L}$ (葛根素  $4.56 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),涡混后加入 900  $\mu\text{L}$  甲醇沉淀蛋白,涡混 5 min,超声 5 min,10 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 6 min,转移上清液,40 °C 氮吹仪吹干,残渣用 300  $\mu\text{L}$  体积分数 50% 甲醇水复溶,涡混 3 min,超声 3 min,10 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清液进 UHPLC-MS/MS 分析。

2.3 UHPLC- MS/MS 分析条件

色谱柱: Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm); 柱温: 45 °C; 流动相 A: 0.1% 甲酸乙腈; 流动相 B: 0.1% 甲酸水; 流速: 0.25 mL · min<sup>-1</sup>; 梯度洗脱程序: 0 ~ 0.5 min, 5% A; 0.5 ~ 1 min, 5% ~ 15% A; 1 ~ 3.8 min, 15% ~ 18% A; 3.8 ~ 4.0 min, 18% ~ 90% A; 4.0 ~ 5.0 min, 90% ~ 5% A; 进样量: 2 μL; 质谱条件: 电喷雾电离源 (ESI); 去溶剂气: 氮气, 800 L · h<sup>-1</sup>; 去溶剂气温度: 550 °C; 碰撞气: 氩气, 50 L · h<sup>-1</sup>; 扫描方式为多反应离子监测模式 (MRM)。3,4-二咖啡酰基奎宁酸等 7 种指标性成分及内标化合物的监测离子见表 2。

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性实验 分别取空白生物样品和给药后样品, 按“2.2”项下尿液处理方法操作, 进样分析得相应色谱图, 见图 1。图 1 结果表明, 在选定的色谱条件下, 生物样品的内源性物质不干扰被测物和内标物的测定, 分离度高, 被测物峰型好。提示该方法专属性良好。

2.4.2 标准曲线和线性范围 取空白尿液样品 300 μL, 分别加入“2.1”项下系列浓度的标准溶液, 涡混后分别加入 20 μL 内标溶液, 其余按“2.2”项下尿液处理方法操作, 进样分析, 以 7 种指标成分的峰面积与内标峰面积之比 (A/A<sub>i</sub>) 为纵坐标 (Y), 各物质浓度 (ρ) 为横坐标进行直线回归, 求得直线方程, 即得标准曲线。7 种指标性成分的标准曲线和线性范围见表

3。结果表明, 7 种指标成分在相应的线性范围内线性关系良好, 相关系数 *r* 均大于 0.991 0。

2.4.3 准确度和精密度 按“2.2”项下尿液处理方法配制 7 种指标成分在尿液中低、中、高 3 个浓度的 QC 样品, 每个浓度进行 5 样本分析, 与当日制备的随行标准曲线。测定当天及连续 3 d 的各质控样品浓度, 考察该方法的日内、日间精密度和准确度。

结果见表 4, 绿原酸等 7 种指标成分在尿液样品中的日内和日间精密度 RSD 值均小于 15%, 准确度范围为 90% ~ 110%, 提示该方法精密度、准确度良好, 符合生物样品分析方法要求。

2.4.4 提取回收率和基质效应 取空白尿液样品 300 μL, 按“2.1”项下分别配制低、中、高 3 个浓度的质控样品 (QC), 每个浓度平行 5 份, 按“2.2”项下尿液处理方法操作得 A 样品; 另取空白尿液样品 300 μL, 除不加混合标准溶液外, 其余按“2.2”项下尿液处理方法操作, 向获得的上清液中加入相应低、中、高浓度的混合标准溶液和内标, 吹干复溶后取上清液得 B 样品; 另取上述低、中、高浓度的混合标准溶液与内标, 吹干复溶后取上清液得 C 样品。进样分析并计算提取回收率, 提取回收率计算方法为 B 样品与 A 样品色谱峰面积之比, 基质效应计算方法为 B 样品与 C 样品的色谱峰面积之比。结果见表 4, 绿原酸等 7 种指标成分在尿液样品中提取回收率均大于 80.41%, 表明该方法提取回收率较高, 且不存在明显的基质效应, 符合生物样品分析方法要求。

表 1 羊耳菊 7 种指标成分的系列标准溶液浓度

Tab. 1 The series concentrations of the standard solutions of seven index components

Compound	Series concentration / μg · mL <sup>-1</sup>							
4,5-Dicaffeoylquinic acid	0.017	0.052	0.155	0.465	1.394	4.181	12.543	37.63
Neochlorogenic acid	0.018	0.055	0.164	0.491	1.473	4.420	13.259	39.77
Chlorogenic acid	0.018	0.053	0.158	0.473	1.418	4.255	12.765	38.29
3,4-Dicaffeoylquinic acid	0.017	0.052	0.156	0.467	1.402	4.206	12.617	37.85
1,3-Dicaffeoylquinic acid	0.017	0.052	0.155	0.466	1.399	4.198	12.593	37.77
Cryptochlorogenic acid	0.017	0.052	0.155	0.466	1.399	4.198	12.593	37.77
Galuteolin	0.017	0.052	0.156	0.467	1.402	4.206	12.617	37.85

表 2 羊耳菊 7 个指标成分及内标化合物的质谱分析条件

Tab. 2 Mass spectrometric analysis conditions of seven components and IS

Compound	Iron pair ( <i>m/z</i> )	Cone voltage/V	Collision voltage/V	ESI
4,5-Dicaffeoylquinic acid	515.29→173.08	35	25	-
Neochlorogenic acid	353.15→191.03	25	15	-
Chlorogenic acid	353.17→191.04	25	15	-
3,4-Dicaffeoylquinic acid	515.27→353.15	25	15	-
1,3-Dicaffeoylquinic acid	515.29→353.16	35	17	-
Cryptochlorogenic acid	353.21→173.08	35	17	-
Galuteolin	447.29→285.02	25	15	-
Puerarin	417.16→297.07	30	15	+

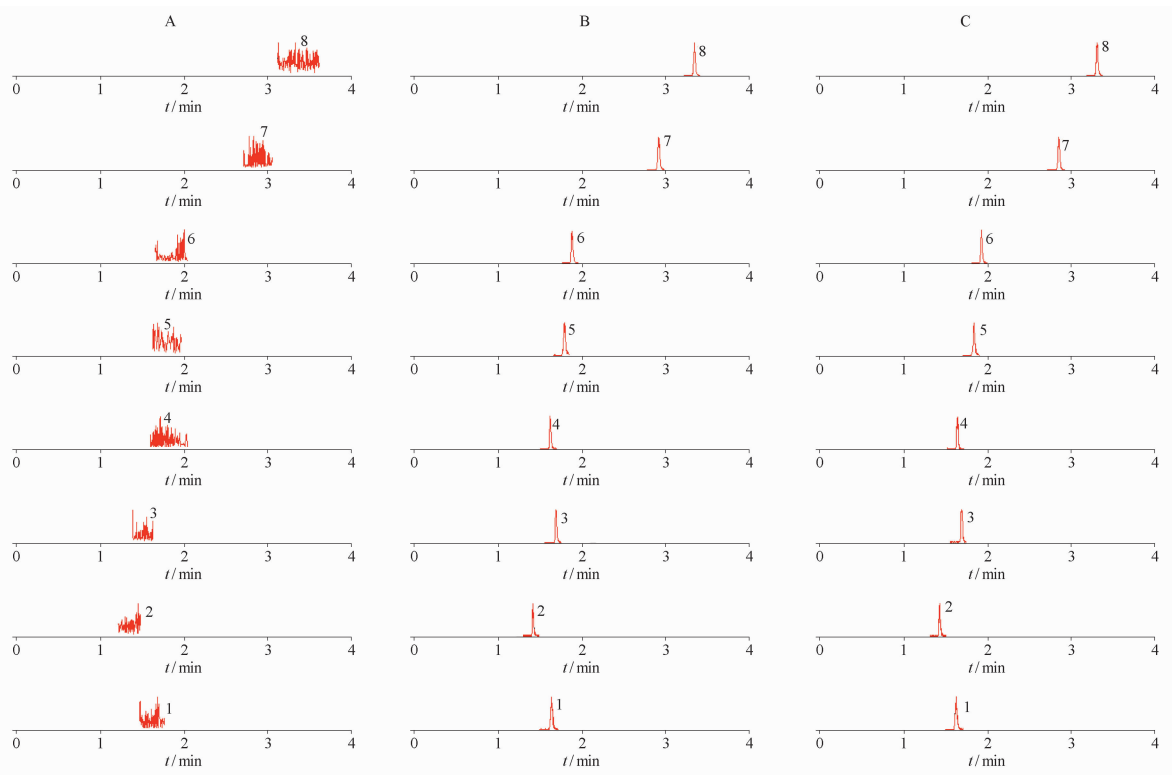


图1 羊耳菊 7 个指标性成分及内标在尿液样品中的 UPLC-MS/MS 图谱

A - 空白尿液; B - 空白尿液加对照品溶液; C - 给药后样品; 1 - 绿原酸; 2 - 新绿原酸; 3 - 隐绿原酸; 4 - 葛根素; 5 - 1,3-二咖啡酰基奎宁酸; 6 - 木犀草苷; 7 - 3,4-二咖啡酰基奎宁酸; 8 - 4,5-二咖啡酰基奎宁酸

Fig. 1 Typical UPLC-MS/MS chromatograms of seven index components and IS in rat urine

A - blank urine sample; B - blank urine spiked with control solution; C - measured sample; 1 - chlorogenic acid; 2 - neochlorogenic acid; 3 - cryptochlorogenic acid; 4 - puerarin; 5 - 1,3-dicaffeoylquinic acid; 6 - galuteolin; 7 - 3,4-dicaffeoylquinic acid; 8 - 4,5-dicaffeoylquinic acid

表3 新绿原酸等 7 个指标性成分在尿液样品中的标准曲线及线性范围

Tab. 3 Standard curves and linear range of seven index components such as neochlorogenic acid, etc. in urine

Compound	Line range / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Calibration curve	<i>r</i>
4,5-Dicaffeoylquinic acid	0.017 - 37.63	$Y = 268.09\rho + 20.63$	0.999 2
Neochlorogenic acid	0.018 - 39.77	$Y = 48.07\rho + 15.644$	0.992 0
Chlorogenic acid	0.018 - 38.29	$Y = 131.01\rho + 12.962$	0.999 8
3,4-Dicaffeoylquinic acid	0.017 - 37.85	$Y = 101.26\rho + 16.586$	0.993 3
1,3-Dicaffeoylquinic acid	0.017 - 37.77	$Y = 70.867\rho - 0.637 9$	0.998 4
Cryptochlorogenic acid	0.017 - 37.77	$Y = 118.51\rho + 9.199 5$	0.998 9
Galuteolin	0.017 - 37.85	$Y = 211.35\rho - 0.494 9$	0.991 0

**2.4.5 样品稳定性** 取空白生物样品,按“2.1”项下方法操作,制成低、中、高 3 个浓度的尿液 QC,每个浓度进行 5 样本分析,分别考察尿液样品经历 3 次冻融循环以及处理后在进样器中放置 6 h 的稳定性。结果见表 5,尿液样品在自动进样器中放置 6 h 和反复冻融 3 次后,样品中 7 个成分的峰面积偏差均在 15% 以内,表明尿液中待测物在自动进样器中放置 6 h 和反复冻融 3 次后的稳定性良好。

## 2.5 实验结果

按“2.2”项下方法测定尿液样品,并以随行标准曲线计算不同时间段样品中待测物的浓度,根据相应时间段的样品体积计算排泄量及累积排泄量,见表 6、7。累积排泄量与给药剂量的比值即为累积排泄率,以时间为横坐标,累积排泄率为纵坐标绘制累积排泄率-时间曲线,见图 2。结果显示,新绿原酸、3,4-二咖啡酰基奎宁酸、4,5-二咖啡酰基奎宁酸和木犀草苷在 12 ~ 24 h 排泄量最大,排泄量分别占给药量的  $(1.00 \pm 0.17)\%$ 、 $(2.16 \pm 0.75)\%$ 、 $(1.45 \pm 0.17)\%$  和  $(0.29 \pm 0.05)\%$ ,24 h 后排泄量减少;绿原酸、隐绿原酸和 1,3-二咖啡酰基奎宁酸在 6 ~ 12 h 排泄量最大,在 6 ~ 12 h 排泄量最大,排泄量分别占给药量的  $(0.89 \pm 0.11)\%$ 、 $(0.77 \pm 0.06)\%$  和  $(0.35 \pm 0.02)\%$ ,12 h 后排泄量减少。在 0 ~ 36 h 内,7 种成分在尿液中的累积排泄率分别为新绿原酸  $(2.62 \pm 0.35)\%$ ,绿原酸  $(2.70 \pm 0.16)\%$ ,隐绿原酸  $(2.22 \pm 0.17)\%$ ,1,3-二咖啡酰基奎宁酸  $(1.14 \pm 0.17)\%$ ,3,4-二咖啡酰基奎宁酸

表4 羊耳菊中7个指标成分在大鼠尿液中的准确度、精密度、回收率和基质效应考察结果.  $n=5, \bar{x} \pm s$

Tab.4 The result of accuracy, precision, recovery and matrix effect of seven index components such as neochlorogenic acid, etc. in rat urine.  $n=5, \bar{x} \pm s$

Compound	$\rho$	Accuracy	Inter-day precision	Intra-day precision	Recovery	Matrix effect
	$/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\%$	RSD/ $\%$	RSD/ $\%$	$\%$	$\%$
Neochlorogenic acid	0.052	$102.1 \pm 7.4$	13.2	12.1	$82.24 \pm 9.9$	$89.11 \pm 3.2$
	1.47	$98.88 \pm 6.7$	9.8	5.5	$96.96 \pm 8.2$	$92.33 \pm 5.5$
	13.26	$99.21 \pm 3.4$	4.3	5.9	$97.99 \pm 6.4$	$91.23 \pm 4.6$
Chlorogenic acid	0.053	$109.1 \pm 16.5$	14.1	9.1	$98.64 \pm 6.3$	$94.19 \pm 7.9$
	1.42	$100.9 \pm 4.3$	6.9	5.7	$102.52 \pm 9.2$	$96.25 \pm 4.3$
	12.76	$98.9 \pm 2.3$	4.1	6.4	$99.63 \pm 5.7$	$98.69 \pm 3.1$
Cryptochlorogenic acid	0.053	$105.1 \pm 12.1$	14.1	12.8	$80.41 \pm 9.4$	$94.43 \pm 6.7$
	1.39	$103.1 \pm 5.6$	7.6	7.2	$89.24 \pm 5.4$	$92.13 \pm 4.4$
	12.59	$98.29 \pm 3.1$	3.3	9.6	$95.84 \pm 4.6$	$93.54 \pm 5.6$
1,3-Dicaffeoylquinic acid	0.052	$101.9 \pm 8.1$	11.1	11.1	$83.41 \pm 9.5$	$93.32 \pm 2.1$
	1.39	$99.5 \pm 4.4$	6.6	9.6	$97.29 \pm 5.8$	$91.39 \pm 4.6$
	12.59	$98.5 \pm 5.6$	4.2	5.8	$96.32 \pm 5.3$	$94.43 \pm 4.8$
3,4-Dicaffeoylquinic acid	0.052	$103.9 \pm 12.1$	13.4	11.2	$91.32 \pm 4.2$	$91.29 \pm 5.7$
	1.4	$99.7 \pm 7.2$	4.2	9.2	$90.55 \pm 5.7$	$87.33 \pm 4.3$
	12.62	$97.8 \pm 2.7$	7.2	8.1	$89.87 \pm 5.3$	$86.12 \pm 5.8$
4,5-Dicaffeoylquinic acid	0.052	$102.2 \pm 9.1$	8.2	9.7	$87.45 \pm 7.9$	$88.12 \pm 4.8$
	1.39	$97.2 \pm 6.2$	5.5	4.4	$92.18 \pm 6.5$	$91.23 \pm 6.9$
	12.54	$99.9 \pm 4.6$	6.6	5.3	$90.22 \pm 7.5$	$92.61 \pm 3.1$
Galuteolin	0.052	$102.1 \pm 10.9$	9.4	10.2	$92.33 \pm 5.3$	$93.34 \pm 4.2$
	1.4	$98.9 \pm 4.9$	8.6	5.3	$90.43 \pm 9.2$	$94.99 \pm 8.9$
	12.62	$99.2 \pm 4.2$	6.8	4.4	$87.69 \pm 5.3$	$92.19 \pm 5.8$

表5 羊耳菊中7个指标成分在大鼠尿液中的稳定性考察结果.  $n=5, \bar{x} \pm s$

Tab.5 The result of stability of seven index components such as neochlorogenic acid, etc. in rat urine.  $n=5, \bar{x} \pm s$

Compound	$\rho$	Different conditions			
		Short-term stability		Three freeze-thaw cycles	
		Accuracy/ $\%$	Precision/RSD $\%$	Accuracy/ $\%$	Precision/RSD $\%$
Neochlorogenic acid	0.052	$98.0 \pm 12.1$	14.2	$98.3 \pm 11.6$	12.5
	1.47	$96.8 \pm 5.7$	7.5	$95.7 \pm 5.8$	11.6
	13.26	$97.3 \pm 4.6$	5.4	$94.5 \pm 3.6$	6.3
Chlorogenic acid	0.053	$101.1 \pm 9.8$	12.3	$98.1 \pm 10.8$	9.5
	1.42	$98.5 \pm 6.1$	5.1	$97.8 \pm 7.6$	8.6
	12.76	$95.5 \pm 4.4$	3.1	$92.5 \pm 4.3$	6.4
Cryptochlorogenic acid	0.053	$101.8 \pm 9.1$	11.3	$97.1 \pm 8.2$	9.7
	1.39	$103.3 \pm 7.5$	5.7	$97.4 \pm 6.5$	8.4
	12.59	$98.2 \pm 5.4$	1.4	$98.9 \pm 4.9$	6.2
1,3-Dicaffeoylquinic acid	0.052	$98.2 \pm 7.2$	9.2	$95.7 \pm 6.1$	11.9
	1.39	$99.5 \pm 5.4$	5.7	$94.8 \pm 8.4$	8.6
	12.59	$99.5 \pm 5.3$	3.1	$97.4 \pm 5.3$	7.8
3,4-Dicaffeoylquinic acid	0.052	$101.1 \pm 9.6$	9.3	$99.3 \pm 12.1$	10.6
	1.4	$96.2 \pm 4.4$	5.4	$98.1 \pm 5.4$	8.5
	12.62	$97.5 \pm 6.1$	3.4	$98.3 \pm 6.2$	6.6
4,5-Dicaffeoylquinic acid	0.052	$95.3 \pm 5.1$	9.5	$96.2 \pm 5.1$	10.7
	1.39	$94.4 \pm 4.3$	5.5	$97.6 \pm 2.2$	7.5
	12.54	$93.6 \pm 5.6$	2.7	$99.9 \pm 5.6$	8.8
Galuteolin	0.052	$100.6 \pm 7.9$	10.4	$99.4 \pm 7.8$	9.6
	1.4	$98.9 \pm 8.9$	6.6	$96.4 \pm 8.9$	8.3
	12.62	$98.5 \pm 4.2$	5.6	$96.2 \pm 5.2$	6.3

表 6 羊耳菊提取物中 7 个指标成分在尿液中的排泄量.  $n=6, \bar{x} \pm s$

Tab. 6 The excretion of seven index components in rat urine after oral administration *Inula cappaort* extracts.  $n=6, \bar{x} \pm s$

Compound	$m(\text{excretion})/\mu\text{g}$				
	0-2 h	2-6 h	6-12 h	12-24 h	24-36 h
Neochlorogenic acid	$1.02 \pm 0.51$	$1.79 \pm 0.14$	$4.87 \pm 1.20$	$5.17 \pm 0.97$	$0.64 \pm 0.12$
Chlorogenic acid	$1.96 \pm 0.25$	$3.39 \pm 0.88$	$4.61 \pm 1.00$	$2.98 \pm 0.83$	$0.98 \pm 0.23$
Cryptochlorogenic acid	$1.72 \pm 0.91$	$3.40 \pm 0.20$	$3.99 \pm 0.39$	$1.66 \pm 0.22$	$0.77 \pm 0.11$
1,3-Dicaffeoylquinic acid	$0.75 \pm 0.04$	$1.12 \pm 0.63$	$1.82 \pm 0.21$	$1.36 \pm 0.49$	$0.85 \pm 0.24$
3,4-Dicaffeoylquinic acid	$1.60 \pm 0.38$	$1.75 \pm 0.16$	$3.09 \pm 0.68$	$11.20 \pm 1.02$	$1.58 \pm 0.83$
4,5-Dicaffeoylquinic acid	$1.35 \pm 0.22$	$1.63 \pm 0.06$	$2.31 \pm 0.44$	$7.52 \pm 1.12$	$0.85 \pm 0.12$
Galuteolin	$0.67 \pm 0.03$	$0.74 \pm 0.02$	$0.84 \pm 0.17$	$1.52 \pm 0.52$	$0.48 \pm 0.07$

表 7 羊耳菊提取物中 7 个指标成分在尿液中的累积排泄量.  $n=6, \bar{x} \pm s$

Tab. 7 The cumulative excretion of seven index components in rat urine after oral administration *Inula cappaort* extracts.  $n=6, \bar{x} \pm s$

Compound	$m(\text{cumulative excretion})/\mu\text{g}$				
	0-2 h	0-6 h	0-12 h	0-24 h	0-36 h
Neochlorogenic acid	$1.02 \pm 0.51$	$2.81 \pm 0.43$	$7.68 \pm 1.35$	$12.85 \pm 2.30$	$13.50 \pm 2.40$
Chlorogenic acid	$1.96 \pm 0.25$	$5.35 \pm 1.12$	$9.96 \pm 2.14$	$12.94 \pm 2.96$	$13.92 \pm 3.19$
Cryptochlorogenic acid	$1.72 \pm 0.91$	$5.12 \pm 0.42$	$9.11 \pm 0.80$	$10.77 \pm 1.02$	$11.54 \pm 1.14$
1,3-Dicaffeoylquinic acid	$0.75 \pm 0.04$	$1.87 \pm 0.67$	$3.69 \pm 0.89$	$5.06 \pm 1.38$	$5.90 \pm 1.60$
3,4-Dicaffeoylquinic acid	$1.60 \pm 0.38$	$3.36 \pm 0.54$	$6.44 \pm 1.22$	$17.64 \pm 2.23$	$19.23 \pm 3.05$
4,5-Dicaffeoylquinic acid	$1.35 \pm 0.22$	$2.98 \pm 0.27$	$5.29 \pm 0.72$	$12.81 \pm 1.87$	$13.66 \pm 1.99$
Galuteolin	$0.67 \pm 0.03$	$1.42 \pm 0.05$	$2.26 \pm 0.34$	$3.78 \pm 0.87$	$4.26 \pm 0.93$

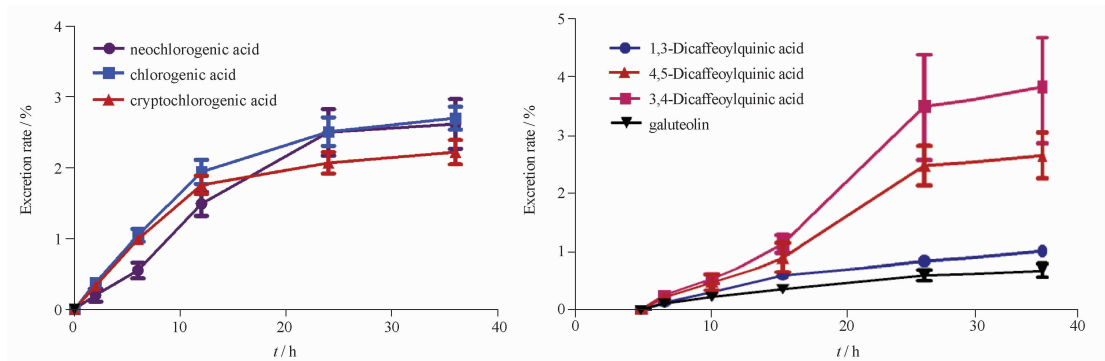


图 2 羊耳菊提取物中 7 个指标成分在尿液中的累积排泄率-时间曲线.  $n=6, \bar{x} \pm s$

Fig. 2 The cumulative excretion curves of seven index components in rat urine after oral administration *Inula cappaort* extracts.  $n=6, \bar{x} \pm s$

( $3.72 \pm 0.89$ )%、4,5-二咖啡酰基奎宁酸( $2.64 \pm 0.36$ )%和木犀草苷( $0.81 \pm 0.13$ )%。结果表明,7种成分在尿液中的原型排泄率均较低,累积排泄率不足5%。

### 3 讨论

本实验建立了 HPLC-MS/MS 的测定方法,同时测定羊耳菊 7 种成分在尿液中的含量。HPLC-MS/MS 技术集分离、定性和定量于一体,具有分析速度快、选择性强、灵敏度高和重复性好等优点,可同时

对同一样品中多种药物成分进行检测。结果显示,各待测组分、内标峰与杂质峰可完全分离,具有较高的专属性,灵敏度高,重复性好,符合生物样品的分析要求。

本实验结果显示,羊耳菊提取物中 7 种成分在大鼠尿液中的原型排泄率较低,累积排泄率小于 5%,提示羊耳菊提取物在大鼠体内可能存在广泛的代谢过程或其他排泄途径。课题组前期对羊耳菊提取物在大鼠体内的药动学过程进行了研究,在血浆中几乎检测不到咖啡酰基奎宁酸类成分的原型,在大鼠

胆汁及粪便中检测到大量代谢产物<sup>[9-10]</sup>,有关文献显示该类成分生物利用度较低,易与肠道菌群中的还原酶、酯酶等反应而生成代谢产物<sup>[12-14]</sup>,这可能是引起奎宁酸类成分在大鼠尿液样品含量较低的原因。在本次实验中,羊耳菊提取物中木犀草苷在0~36 h的累积排泄量最低,(4.26±0.93)μg,且累积排泄率小于1%,明显低于其他化合物,可能由于肝脏和肠道是大部分黄酮类化合物的主要代谢场所,经口服给药后,黄酮类化合物一般在胃肠道内发生代谢,通过胃肠吸收进入体内的成分主要为代谢产物。黄酮苷在肠道中易被肠道菌群水解为黄酮苷元而吸收进入血液,黄酮苷元进入血液后,在肝脏中容易发生氧化、结合等反应而生成代谢产物<sup>[15]</sup>。有研究显示,大鼠口服木犀草苷后,在尿液、粪便等排泄物中检测到木犀草苷经氧化、葡萄糖醛酸化等反应的代谢产物,未检测到其原型,上述原因可能导致木犀草苷在大鼠尿液中原型排泄量少,原型排泄率低<sup>[16]</sup>。

本实验建立了UPLC-MS/MS分析方法,该方法准确、灵敏、重复性好,适用于多种成分的定量检测。通过研究灌胃给予羊耳菊提取物后大鼠尿液中7个成分的排泄情况,对在大鼠体内过程及药效物质基础研究具有指导意义,为进一步研究羊耳菊提取物在尿液中评价药物疗效提供依据。

## REFERENCES

- [1] GONG Z P, XIONG D F F, LI M, *et al.* Analysis of chemical constituents of effective components of *Inula cappa*[J]. *J Anhui Agri Sci* (安徽农业科学), 2017, 45(29):131-133+152.
- [2] WANG A M, LI M, SUN J, *et al.* Study on antibacterial and anti-inflammatory activities of *Inula cappa*[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2018, 29(7):1580-1584.
- [3] GONG Z P, LI M, XIONG D F F, *et al.* Evaluation of anti-inflammatory activity of *Inula cappa* extract based on inflammation model *in vitro*[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017, 29(12):2050-2055.
- [4] MO J J, XU M D, YANG D D, *et al.* Experimental study on anti-inflammatory and analgesic effects of ethanol extracts of dong-medicine *Inula cappa*[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2012, 18(21):258-260.
- [5] WU P, LI M, GONG Z P, *et al.* Analysis of intestinal absorption characteristics of *Inula cappa* extract by *in situ* intestinal circulating perfusion model[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2018, 24(2):1-8.
- [6] LOU Q. The study on tissue distribution and excretion of GDH in rats [D]. Guangdong Pharmaceutical University(广东药学院), 2015.
- [7] LIU L L, LI H, HE D, *et al.* Metabolic and Excretory Process of Citri Reticulatae Pericarpium Viride and Citri Reticulatae Pericarpium in Rats' Urine and Feces Analyzed by RRLC-QqQ-MSn [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2018, 43(22):4519-4527.
- [8] GONG Z P, CHEN T T, HOU J Y, *et al.* Analysis of components in plasma from effective fractions of *Inula cappa* based on UHPLC/Q-TOF/MS[J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2017, 33(11):1605-1610.
- [9] GONG Z P, HOU J Y, HOU J, *et al.* Metabolism of active fractions of *Inula cappa* in rat bile[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017, 29(10):1700-1717.
- [10] GONG Z P, WU L L, WU P, *et al.* Analysis of metabolites of *Inula cappa* extract in rat feces[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2017, 23(24):100-105.
- [11] WEN Z, XIA W, SI H F, *et al.* Chemical constituents of *Inula cappa*[J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2017, 52(1):25-30.
- [12] TOMAS-BARBERAN F, GARCÍA-VILLALBA R, QUARTIERI A, *et al.* *In vitro* transformation of chlorogenic acid by human gut microbiota[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58(5):1122-1131.
- [13] LI Y, ZHOU M M, XIN L N, *et al.* Advances in study on gut flora metabolism of chlorogenic acid[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2015, 40(4):610-614.
- [14] DEL RIO D, STALMACH A, CALANI L, *et al.* Bioavailability of coffee chlorogenic acids and green tea flavan-3-ols[J]. *Nutrients*, 2010, 2(8):820-833.
- [15] TANG L, FENG Q, ZHAO J, *et al.* Involvement of UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases in the liver and intestinal first-pass metabolism of seven flavones in C57 mice and humans *in vitro* [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(5):1460-1467.
- [16] LI J M, HE M Z, FENG Y L, *et al.* *In-vivo* studies on metabolism of luteolin and luteoloside in rats[J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*(中药新药与临床药理), 2017, 28(1):61-68.

(收稿日期:2019-01-23)