

UHPLC-Qtrap-MS/MS 法研究灯盏细辛成分 在血管性痴呆模型大鼠的药代动力学及 网络药理学

高雪萌¹, 程硕涵¹, 章宸², 张晓东¹, 李梦宇¹,
周文斌¹, 再帕尔·阿不力孜^{1,2}

(1. 中央民族大学药学院, 民族医药教育部重点实验室, 北京 100081;

2. 中央民族大学生命与环境科学学院, 质谱成像与代谢组学国家民委重点实验室, 北京 100081)

摘要: 采用超高效液相色谱-串联四极杆-线性离子阱质谱(UHPLC-Qtrap-MS/MS)技术对芹菜素、野黄芩苷、丁香酸、水杨酸、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷、东莨菪亭等 6 种灯盏细辛入血成分在血管性痴呆(VaD)模型大鼠血浆中的含量变化进行定量分析, 并进行药代动力学参数计算。以 0.05%甲酸-水和乙腈为流动相, 在 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μ m)上梯度洗脱; 采用多反应监测(MRM)模式, 电喷雾离子源(ESI)进行质谱检测; 随后使用 DAS2.0 软件进行药代动力学参数计算。结合入血成分分析结果, 采用网络药理学方法构建入血成分-疾病靶点-代谢通路网络, 推测潜在作用靶点。结果表明, 在 VaD 模型组中, 丁香酸、野黄芩苷、东莨菪亭、水杨酸的体内暴露量均低于假手术组, 可能存在代谢加快或排泄增加的现象; 而野黄芩苷、水杨酸、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷在大鼠体内存在双峰吸收, 可能存在肝肠循环现象; 在所有入血成分中, 野黄芩苷的体内暴露量最高。网络药理学研究发现, 灯盏细辛主要入血成分共作用于 12 个疾病靶点, 与 5 条信号通路有关; 其中, 药效成分野黄芩苷主要通过作用于丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路对 VaD 产生干预作用。本研究可为灯盏细辛的药代动力学研究提供支持, 同时对深入理解其作用机制提供参考。

关键词: 超高效液相色谱-串联四极杆-线性离子阱质谱(UHPLC-Qtrap-MS/MS); 灯盏细辛; 入血成分; 药代动力学; 网络药理学

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2025)05-0602-13

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0034

CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0034

Pharmacokinetic and Network Pharmacology Studies for the Prototype Components of *Erigeron Breviscapus* in Rat Model of Vascular Dementia Using UHPLC-Qtrap-MS/MS

GAO Xue-meng¹, CHENG Shuo-han¹, ZHANG Chen², ZHANG Xiao-dong¹, LI Meng-yu¹,
ZHOU Wen-bin¹, ABLIZ Zeper^{1,2}

(1. Key Laboratory of Ethnomedicine, Ministry of Education, School of Pharmacy, Minzu University of China,
Beijing 100081, China;

2. Key Laboratory of Mass Spectrometry Imaging and Metabolomics, State Ethnic Affairs Commission,
Minzu University of China, Beijing 100081, China)

Abstract: The whole dried plant of *Erigeron breviscapus* is clinically used in traditional Chinese medicine, and named as “Deng-Zhan-Xi-Xin”. The herb is primarily distributed in Yunnan, Guangxi, and Guizhou provinces of China, and its traditional therapeutic effects include promoting blood circulation, unblocking meridians, relieving pain, dispelling wind and cold. Nowadays, it is commonly prescribed for pathological conditions including hemiplegia, coronary heart disease, cerebral thrombosis, rheumatism, and microcirculatory disorders. Pharmacological studies have demonstrated its neuroprotective effects, such as microcirculation improvement, lipid-lowering activity, and inhibition of platelet aggregation. Chemical components including caffeoyl acid and its analogues, as well as flavonoids and their glycosides, have been reported, and the flavonoid glycoside of scutellarin has regarded as an active component related to the efficacy of the herb. Current *in vivo* pharmacokinetic studies on *E. breviscapus* have mostly focused on its injectable formulations or pure compounds in normal rats, while multi-component pharmacokinetic studies of its aqueous decoction in vascular dementia (VaD) rat models remain insufficient. As a result, the study established a bilateral common carotid artery occlusion-induced VaD rat model, which better represented clinical cases. The pharmacokinetics of multiple blood-absorbed components from the aqueous decoction was investigated by ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-linear ion trap mass spectrometry (UHPLC-Qtrap-MS/MS). Furthermore, network pharmacology analysis was employed to predict the potential targets of these components, and interaction networking for compound-protein-pathway was constructed. The UHPLC-Qtrap-MS/MS technique was employed to quantitatively analyze the content changes of six components, including apigenin, scutellarin, syringic acid, salicylic acid, apigenin-7-*O*-glucuronide and scopoletin in the plasma of rat model of vascular dementia. Additionally, the pharmacokinetic parameters were calculated. A gradient elution was performed on an ACQUITY UPLC HSS T3 chromatographic column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), using 0.05% formic acid-water as mobile phase A and acetonitrile as mobile phase B. A quantitative analytical method was established by optimizing declustering potential (DP) and collision energy (CE) values, followed by comprehensive methodological validation covering specificity, linearity, precision, accuracy, stability, extraction recovery, and matrix effects. Mass spectrometry detection was conducted under multi-reaction monitoring (MRM) mode with electrospray ionization source (ESI). Subsequently, the DAS 2.0 software was utilized to calculate detailed pharmacokinetic parameters. The network pharmacology method was applied to construct a network of chemical components-disease targets-metabolic pathways. Based on the blood-absorbed components, the potential active targets were inferred. The analysis results showed that, compared with the sham-operated group, the *in vivo* exposure of syringic acid, scutellarin, scopoletin, and salicylic acid in the vascular dementia model group is lower, which may be attributed to accelerated metabolism and increased excretion of these components. Additionally, scutellarin, salicylic acid, and apigenin-7-*O*-glucuronide exhibits a double-peak absorption, suggesting a possible enterohepatic circulation phenomenon. Among all detected active components, scutellarin has the highest *in vivo* exposure. Network pharmacology analysis revealed that the components act on a total of 12 disease targets and are related to 5 signaling pathways. The active ingredient scutellarin mainly exerts a therapeutic effect on vascular dementia by acting on the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. The potential multi-target mechanisms of *E. breviscapus* via network pharmacology remains experimental validation in future. These rational findings provide support for the pharmacokinetic study of *E. breviscapus* and offer a reference for deeper understanding of its mechanism of action.

Key words: ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-linear ion trap mass spectrometry (UHPLC-Qtrap-MS/MS); *Erigeron breviscapus*; prototype compounds; pharmacokinetics; network pharmacology

血管性痴呆(VaD)是一种由缺血性、出血性脑卒中引起,并造成记忆、思维和行为等严重认知功能障碍的脑区低灌注的脑血管疾病,在我国痴呆人群中的发病率仅次于阿尔茨海默病^[1-2]。研究表明,氧化应激损伤是造成 VaD 认知缺陷的一种重要机制^[3],主要表现为大量脂质过氧化产物和自由基的产生、兴奋性递质的释放和炎症反应的加剧、神经元的死亡和梗死面积的增加等。其中,海马区神经元的凋亡及炎症反应与丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路密切相关,该信号通路在 VaD 的发展进程中发挥重要作用^[4-5]。

中药灯盏细辛(*Erigeron breviscapus*)的主要化学成分为黄酮苷类、咖啡酸酯类及香豆素类。其中,野黄芩苷(5,6,7,4'-四羟基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷)又称灯盏乙素,被认为是抗 VaD 的主要药效成分,其对脑缺血再灌注损伤有较好的改善作用^[6-7]。中药灯盏细辛注射液可改善患者的血脂指数和血液粘度,促进氧自由基和活性氧化物的代谢与排泄,且能显著改善脑卒中患者的预后^[8]。此外,灯盏细辛提取物可降低脑缺血患者血浆颗粒膜蛋白、血小板活化因子和血小板聚集率,改善血小板活性指数,缓解短暂性脑缺血的发作^[9-10]。与单独给予野黄芩苷单体相比,给予灯盏细辛注射液后,野黄芩苷的体内暴露量显著增加,代谢速度减慢,且在脑中的蓄积量增加,而在小肠组织中的含量降低,提示注射液中的其他成分影响了野黄芩苷的代谢和分布^[11]。目前,关于灯盏细辛的体内代谢研究主要集中于注射液及其单体成分在正常大鼠体内的代谢分析^[12],而对于临床上常用的水煎汤剂在 VaD 大鼠体内的多组分药代动力学研究仍存在不足。

基于此,本研究以双侧颈动脉结扎手术构造 VaD 大鼠模型,建立灯盏细辛水煎剂中入血成分的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析方法,通过绘制药时曲线计算药代动力学参数,比较疾病状态与正常状态的体内代谢差异;同时,结合网络药理学构建入血成分-靶点-疾病相互作用网络,旨在为中药灯盏细辛治疗 VaD 药效物质基础及潜在作用机制提供科学参考。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm): 美国 Waters 公司产品;超高效液相色谱-串联四极杆-线性离子阱质谱仪(UHPLC-Qtrap MS): 美国 SCIEX 公司产品;XP205 型分析天平: 瑞士 Mettler Toledo 公司产品;3-18KS 型冷冻离心机: 美国 Sigma 公司产品;0.22 μm 针头滤器: 英国 Whatman 公司产品。

1.2 试剂与样品

24 只雄性 SD 大鼠(体重(280±20) g, SPF 级,许可证号 SCXK(京)2019-0008): 由北京华阜康生物科技股份有限公司提供。

灯盏细辛药材(批号 220101): 昆明道地中药饮片厂产品,经中央民族大学唐丽教授鉴定为菊科植物短葶飞蓬(*Erigeron breviscapus*)的干燥全草,标本存放于中央民族大学药物分析实验室;东莨菪亭(批号 AFCG2851)、水杨酸(批号 AFCK2453)、丁香酸(批号 AFCE2852)、野黄芩苷(批号 AFBL0861)、芹菜素(批号 AFCH0451)、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷(批号 AFCE1206): 纯度≥98%,成都埃法生物科技有限公司产品;刺芒柄花苷(批号 M02A11S120167): 纯度≥98%,上海源叶生物科技有限公司产品;乙腈、甲酸: LC/MS 级,美国 Fisher 公司产品;纯净水: 杭州娃哈哈集团有限公司产品。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 柱温 40 °C; 流速 0.3 mL/min; 流动相: A 为 0.05%甲酸-水溶液, B 为乙腈; 梯度洗脱程序: 0~12 min(5%~45%B), 12~18 min(45%B), 18~21 min(45%~95%B), 21~23 min(95%B), 23~23.1 min(95%~5%B), 23.1~30 min(5%B); 进样量 3 μL。

1.3.2 质谱条件 采用 Qtrap™6500 四极杆-线性离子阱复合型质谱仪,多反应监测(MRM)扫描模式。喷雾气压强 344.74 kPa,辅助加热气压强 344.74 kPa,气帘气压强 241.32 kPa,离子源温度 450 °C,离子化电压-4 500 V。待测化合物的定量、定性离子对及优化后的质谱参数列于表 1。

1.4 血浆样本采集

采用双侧颈总动脉结扎的方法构建 VaD 大鼠模型,假手术组只分离双侧颈总动脉但不结扎。取 24 只雄性 SD 大鼠,在独立通风笼具(IVC)系统中适应性饲养一周后,随机分为 4 组,即假手术组、假手术给药组、模型组、模型给药组,每组 6 只。其中,模型给药组和假手术给药组大鼠单次灌胃给予灯盏细辛提取物(13.5 g/kg);给药后,于 5、15、30、45 min 和 1、2、4、8、12、24 h 共 10 个时间点,对各组大鼠分别取血 0.6 mL。通过给药组与未给药组的平行对照,校正因手术创伤引起的非药物相关生理波动,以排除非特异性干扰。将血样置于肝素钠抗凝离心管中,在 4 ℃ 下以 3 500 r/min 离心 15 min,吸取上层血浆至离心管中,储存于-80 ℃ 冰箱中,备用。

1.5 实验方法

1.5.1 动物造模方法 模型组大鼠术前 12 h 禁食不禁水,吸入 10%异氟烷麻醉。大鼠仰卧,四肢捆绑于鼠板,拉直颈部剃毛消毒,正中切口,钝性分离各层组织(操作中避免损伤迷走神经和气管);进一步钝性分离双侧颈总动脉后,使用 4-0 号手术线分别在其远心端、近心端双重结扎,随后从中间剪断血管以阻断双侧颈总动脉血流。术后,采用 3-0 号线缝合创面,并用碘伏擦拭消毒。术中需动作轻柔,避免钳夹或过分牵拉

迷走神经,注意无菌原则,行间断缝合。假手术组大鼠只分离双侧颈总动脉而不结扎、剪断,其余操作与模型组一致。

1.5.2 标准曲线溶液制备 分别精密称取适量的野黄芩苷、芹菜素、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、水杨酸、东莨菪亭、丁香酸标准品,用甲醇配制成单一标准品储备溶液;再精密量取适量各标准品溶液,用初始流动相溶液(5%乙腈水溶液)逐级稀释为一系列混合标准品溶液,于 4 ℃ 保存,备用。

1.5.3 QC 样本溶液制备 用初始流动相稀释标准品储备溶液得到 QC 样本溶液。各化合物低(LQC)、中(MQC)、高(HQC)浓度分别如下:野黄芩苷为 75、300 和 500 μg/L;东莨菪亭为 18、72 和 120 μg/L;丁香酸为 30、120 和 200 μg/L;芹菜素为 18、72 和 120 μg/L;芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷为 150、250 和 375 μg/L;水杨酸为 75、300 和 500 μg/L。QC 样本溶液及标准曲线溶液均在测定前现用现配。

1.5.4 内标溶液制备 精密称取适量刺芒柄花苷标准品,用甲醇配制成 1 g/L 内标储备液。随后取适量内标储备液,用初始流动相(5%乙腈水)稀释为 1.7 mg/L 内标溶液。

1.5.5 血浆样本处理 将样本解冻 2 h,分别取 80 μL 给药大鼠血浆样本和空白大鼠血浆样本,

表 1 待测成分的定量、定性离子对及优化后的质谱参数

Table 1 Quantitative and qualitative ion pairs of measured components and optimized mass spectrometric parameters

编号 No.	成分 Component	母离子 Precursor ion (<i>m/z</i>)	子离子 Product ion (<i>m/z</i>)	去簇电压 DP/V	碰撞能量 CE/eV
1	丁香酸	197.0	182.0*	-25	-20
		197.0	138.1	-25	-25
2	东莨菪亭	191.0	176.1*	-20	-20
		191.0	148.0	-35	-30
3	芹菜素	269.1	117.1*	-70	-40
		269.1	151.0	-55	-35
4	水杨酸	136.9	93.1*	-20	-25
		136.9	65.1	-20	-40
5	野黄芩苷	461.1	285.0*	-55	-30
		461.1	113.1	-35	-20
6	芹菜素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	445.1	269.1*	-40	-30
		445.1	113.1	-40	-20

注: *表示定量离子对

加入 10 μL 内标溶液(1.7 mg/L 刺芒柄花苷)和 10 μL 初始流动相(5%乙腈水溶液), 涡旋振荡; 以 1 000 r/min 离心 1 min, 加入 400 μL 冰乙腈, 涡旋振荡; 以 12 000 r/min 离心 5 min, 取 400 μL 上清液, 真空离心浓缩至干; 随后加入 100 μL 初始流动相(5%乙腈水溶液)复溶, 涡旋振荡后, 经 96 孔微孔板过滤后进样分析。

1.5.6 方法学考察 专属性: 取 80 μL 空白大鼠血浆样本, 加入 20 μL 初始流动相, 按照 1.5.5 节方法处理样本, 随后进样分析。另取 80 μL 空白血浆样本, 加入 10 μL 混合标准品溶液及 10 μL 内标溶液, 按照 1.5.5 节方法处理样本, 前处理完成后立即进样检测。取给药后 0.5 h 的大鼠血浆样本, 加入 10 μL 内标溶液和 10 μL 初始流动相(5%乙腈水溶液), 按照 1.5.5 节方法处理样本, 通过自动进样器导入 UHPLC-Qtrap-MS/MS 并分析。观察内标溶液及混合标准品溶液相应保留时间周围是否出现干扰峰。

线性动态范围: 分别取 80 μL 空白大鼠血浆样本, 首先加入 10 μL 各水平混合标准品溶液和 10 μL 内标溶液, 按照 1.5.5 节方法处理后进样分析。使用最小加权二乘法($1/X^2$), 以待测成分浓度为横坐标, 待测组分峰面积/内标峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 并得到线性方程, 将其最低浓度点设置为定量下限。

精密度和准确度: 分别取 80 μL 空白大鼠血浆样本, 首先加入 10 μL 定量下限和低、中、高 4 个浓度水平的混合标准品溶液及 10 μL 内标溶液, 每个浓度水平样本平行制备 6 份, 按照 1.5.5 节方法处理样本, 随后分析在一天内进样的批内精密度及连续 3 天进样的批间精密度。

回收率和基质效应: 分别取 80 μL 空白大鼠血浆样本, 首先加入 400 μL 冰乙腈, 以 2 500 r/min 涡旋 5 min, 随后分别加入 10 μL 定量下限和低、中、高 4 个浓度水平的混合标准品溶液及 10 μL 内标溶液, 每个浓度水平样本平行制备 6 份, 涡旋振荡 1 min; 以 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液。真空离心浓缩至干, 随后加入 100 μL 初始流动相(5%乙腈水溶液)复溶, 涡旋振荡后, 经 96 孔微孔板过滤后进样分析, 记录峰面积为 D 。

分别取 80 μL 乙腈, 其余步骤同空白大鼠血浆样品, 记录峰面积为 E 。

分别取 80 μL 空白大鼠血浆样本, 首先加入

10 μL 定量下限和低、中、高 4 个浓度水平的混合标准品溶液及 10 μL 内标溶液, 每个浓度水平样本平行制备 6 份, 随后加入 400 μL 冰乙腈, 涡旋振荡 5 min, 真空离心浓缩至干, 随后加入 100 μL 初始流动相(5%乙腈水溶液)复溶, 涡旋振荡后, 经 96 孔微孔板过滤后进样分析, 记录峰面积为 F 。

基质效应 = $D/E \times 100\%$; 提取回收率 = $F/D \times 100\%$ 。

稳定性: 分别取 80 μL 空白大鼠血浆样本, 加入 10 μL 定量下限和低、中、高 4 个浓度水平的混合标准品溶液及 10 μL 内标溶液, 按照 1.5.5 节方法处理样本。随后在常温条件下放置 4 h 考察短期稳定性; 在 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中反复冻融 3 次考察冻融循环稳定性($n=6$); 在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 自动进样器放置 24 h 考察稳定性; 每组中每个浓度水平样本平行制备 6 份。

1.5.7 数据处理 质谱数据分析: 使用 PeakViewTM1.2 软件提取化合物色谱图, Multiquant[®]2.2 软件计算化合物峰面积, GraphPad Prism 9.5.0 软件绘制标准曲线拟合和血药浓度-时间曲线, DAS2.0 软件计算药代动力学参数。

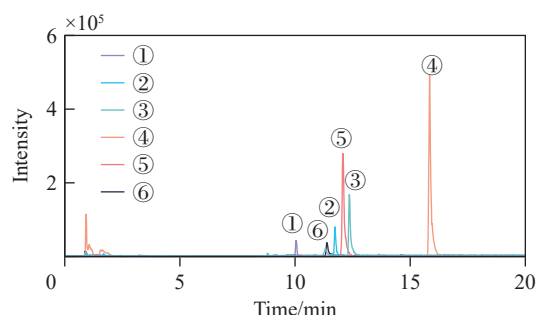
网络药理学分析: 将入血成分输入 TCMSP(<https://old.tcmsp-e.com/>)、SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、ETCM(<http://www.tcmip.cn/ETCM/>)等数据库搜索入血成分相关靶点, 建立入血成分靶点库; 以 VaD 为关键词, 在 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)、OMIM(<https://omim.org/>)、DISGENET(<https://disgenet.com/>)等数据库搜索疾病相关靶点, 建立疾病靶点库。筛选入血成分靶点库和疾病靶点库的交集, 将其作为灯盏细辛治疗 VaD 的潜在靶点, 并导入 DAVID(<https://davidbioinformatics.nih.gov/>)数据库进行通路分析。使用 Cytoscape3.10.2 软件构建灯盏细辛治疗 VaD 潜在靶点及代谢调控网络图。

2 结果与讨论

2.1 药代动力学研究指标成分的选择

根据课题组前期研究结果, 大鼠口服灯盏细辛水煎液后, 丁香酸、东莨菪亭、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、芹菜素、水杨酸、野黄芩苷为 VaD 大鼠血浆中含量最高的 6 种成分, 它们普遍具有神经保护^[13]、抗炎^[14-15]与抗氧化应激^[16-17]等

药理活性,与VaD的治疗密切相关。因此,选择这6种成分开展药代动力学研究,其提取离子流色谱图示于图1。



注:①丁香酚;②东莨菪亭;③芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷;
④芹菜素;⑤水杨酸;⑥野黄芩苷

图1 6种入血成分的提取离子流色谱图
Fig. 1 Extraction ion flow chromatogram of 6 components into blood

2.2 方法学考察结果

2.2.1 专属性 空白、混合标准品及给药0.5 h的血浆样本色谱图分别示于图2。内标溶液及混合标准品溶液相应保留时间周围未见干扰峰,且混合标准品溶液及给药后血浆样本中的待测成分分离度良好,峰形较好,表明方法专属性良好。

2.2.2 线性动态范围 大鼠血浆中6个原型成分的线性方程、相关系数及线性范围列于表2。可见,在线性浓度范围内的线性关系良好,线性相关系数(r^2)在0.993 6~0.997 6之间。

2.2.3 精密度和准确度 大鼠血浆中6个原型成分的精密度和准确度列于表3。准确度范围为86.08%~106.29%,未超过标示值的 $\pm 15\%$;精密度(RSD)为0.64%~14.60%,未超过标示值的 $\pm 15\%$ 。表明该方法的精密度和准确度良好。

2.2.4 稳定性 根据已建立的标准曲线对常温放置、自动进样器放置和冻融循环的样品进行定量分析,准确度在85.16%~112.39%之间,未超过标示值的 $\pm 15\%$;高、中、低浓度RSD在0.90%~14.05%之间,均未超过标示值的 $\pm 15\%$,定量下限RSD在3.39%~17.63%之间,未超过标示值的 $\pm 20\%$ 。表明样品在测试条件下稳定性良好。

2.2.5 提取回收率和基质效应 本实验分别考察了定量下限和低、中、高4个浓度水平的基质效应和提取回收率,结果列于表4。可见,提取回收率RSD在0.82%~14.71%之间,未超过标示

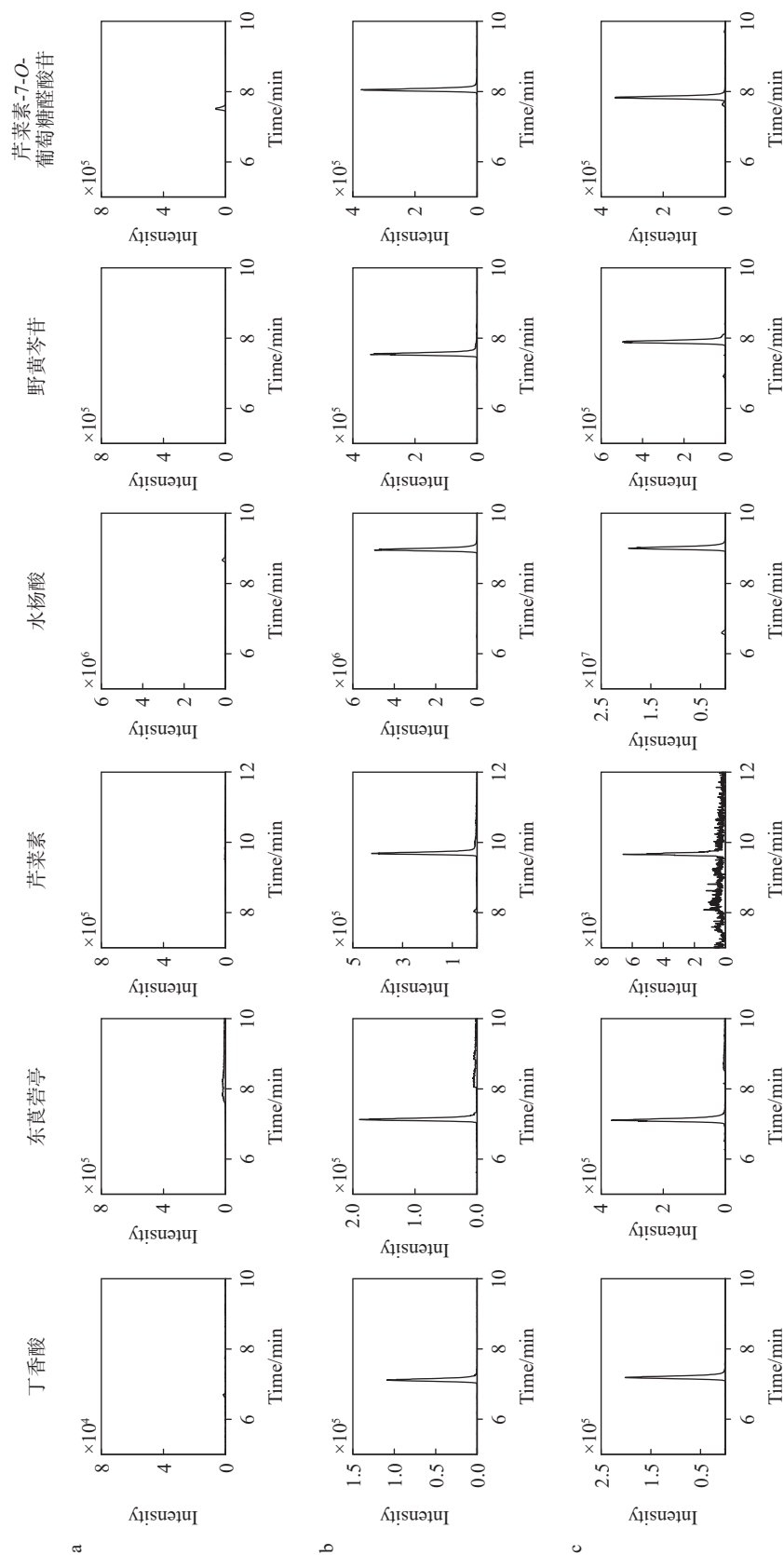
值的 $\pm 15\%$;基质效应RSD在1.64%~14.77%之间,未超过标示值的 $\pm 15\%$ 。表明该方法的提取回收率良好,基质效应能够满足定量分析要求。

2.3 药时曲线及药代动力学参数计算

模型组和假手术组入血成分的血药浓度-时间曲线示于图3,药代动力学参数列于表5。6种入血成分的 $T_{\max}$ 为0.083~9.361 h, $C_{\max}$ 为18.009~949.005 $\mu\text{g/L}$ 。模型组与假手术组相比,入血成分水杨酸、丁香酚、野黄芩苷、东莨菪亭的血药浓度-时间曲线下面积的比值均小于1,提示药物在双侧颈总动脉结扎模型大鼠的体内暴露量降低,可能是代谢加快、排泄增加,或与其相关蛋白结合较多造成;入血成分芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷的血药浓度-时间曲线下面积的比值大于1,表明其在双侧颈总动脉结扎模型大鼠的体内暴露量增加,可能是代谢减慢或排泄减少。芹菜素的模型组与假手术组血药浓度-时间曲线下面积的比值接近于1,表明双侧颈总动脉结扎手术对其体内暴露量影响较小。在所有入血成分中,野黄芩苷的血药浓度-时间曲线下面积最大。在模型组中,野黄芩苷的 $T_{\max}$ 为2.21 h,推测其可能在给药早期发挥疗效;而芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷的 $T_{\max}$ 长达9.36 h,推测其可能在模型大鼠体内暴露的时间更长。通过观察药时曲线可以发现,野黄芩苷、水杨酸、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷存在双峰吸收,表明这些化合物可能存在肝肠循环。由于芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷是芹菜素的糖醛酸化代谢产物,提示两者在体内可能存在相互转化,影响代谢过程,导致药时曲线变化。

2.4 网络药理学结果

通过搜索灯盏细辛提取物6种入血成分和VaD疾病的靶点信息,共得到442个与入血成分相关的靶点,315个与VaD疾病相关的靶点,其中交集靶点共有12个。交集靶点与入血成分作用网络及相关通路示于图4。在VaD疾病的发展进程中,GBA和IGF1R靶点蛋白可能会发生水平降低或活性降低,而其余10个靶点可能会发生水平升高或活性升高。其中,与芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷有关的靶点有TNF、APP、ACHE、SQLE,与野黄芩苷有关的靶点有TNF、ACHE、SQLE,推测野黄芩苷和芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷可能通过降低这些靶点的水平或者减弱这些靶点的活性对VaD产生治疗作用。其



注: a. 空白血浆样本; b. 混合标准品血浆样本; c. 给药 0.5 h 血浆样本

图 2 专属性考察结果

Fig. 2 Results of specific investigation

表 2 线性关系考察

Table 2 Investigation of linear relationship

成分 Component	线性回归方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient (r^2)	线性范围 Linear range/($\mu\text{g/L}$)	定量下限 LLOQ/($\mu\text{g/L}$)
丁香酸	$y=0.00273x-0.0196$	0.9976	5~500	5
东莨菪亭	$y=0.00978x-0.0654$	0.9936	3~300	3
芹菜素	$y=0.03455x-0.1483$	0.9946	3~300	3
水杨酸	$y=0.06261x-0.1409$	0.9975	12.5~1250	12.5
野黄芩苷	$y=0.000224x-0.00454$	0.9938	12.5~1250	12.5
芹菜素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	$y=0.01001x-0.1361$	0.9946	12.5~625	12.5

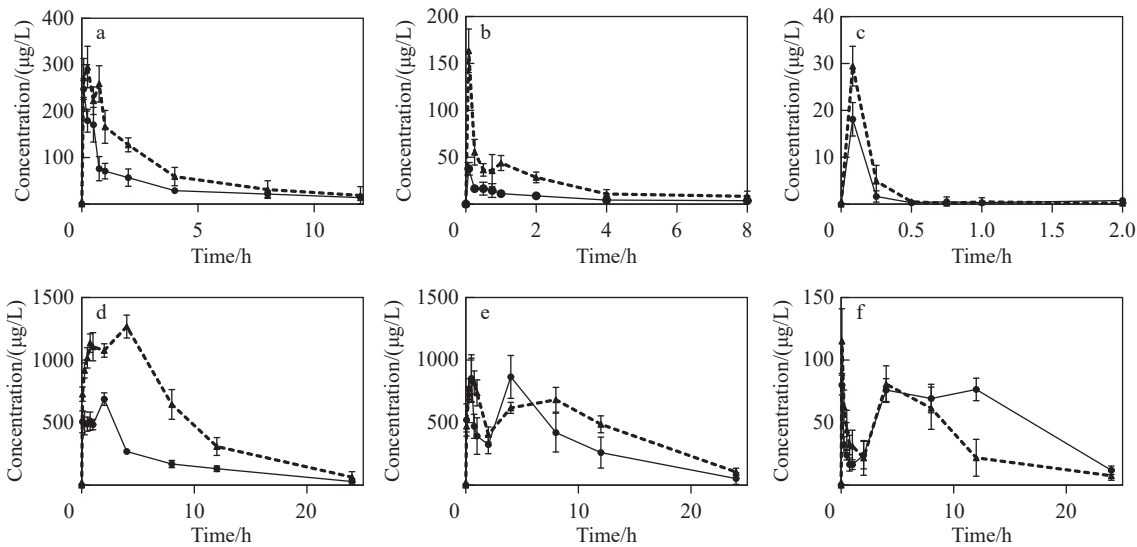
表 3 批内和批间精密度及准确度

Table 3 Precision and accuracy of intra-batch and inter-batch

成分 Component	浓度(标示值) Concentration/ ($\mu\text{g/L}$)	批内 Intra-batch			批间 Inter-batch		
		测量值 Measurement ($\bar{x}\pm\text{SD}$, $\mu\text{g/L}$)	准确度 Accuracy (RE/%)	精密度 Precision (RSD/%)	测量值 Measurement ($\bar{x}\pm\text{SD}$, $\mu\text{g/L}$)	准确度 Accuracy (RE/%)	精密度 Precision (RSD/%)
丁香酸	LLOQ(5)	5.14 $\pm$ 0.42	102.73	8.10	5.03 $\pm$ 0.57	100.52	11.30
	LQC(30)	28.08 $\pm$ 1.65	93.60	5.88	26.41 $\pm$ 1.73	88.06	6.56
	MQC(120)	118.20 $\pm$ 1.56	98.50	1.32	120.68 $\pm$ 6.34	100.57	5.26
	HQC(200)	204.20 $\pm$ 5.68	102.70	2.78	202.81 $\pm$ 12.35	101.60	6.09
东莨菪亭	LLOQ(3)	3.19 $\pm$ 0.10	106.29	3.16	3.01 $\pm$ 0.21	100.56	7.08
	LQC(18)	16.59 $\pm$ 0.81	92.15	4.87	16.15 $\pm$ 0.63	89.74	3.89
	MQC(72)	71.03 $\pm$ 2.78	98.66	3.91	68.19 $\pm$ 3.03	94.71	4.44
	HQC(120)	118.20 $\pm$ 2.53	98.52	2.14	118.30 $\pm$ 4.97	105.30	4.19
芹菜素	LLOQ(3)	2.95 $\pm$ 0.20	98.23	6.76	2.83 $\pm$ 0.29	94.39	10.40
	LQC(18)	18.02 $\pm$ 1.46	100.10	8.19	16.90 $\pm$ 1.91	93.89	11.30
	MQC(72)	67.79 $\pm$ 2.07	94.16	3.09	64.93 $\pm$ 3.70	90.19	5.70
	HQC(120)	104.40 $\pm$ 2.56	87.00	2.45	99.44 $\pm$ 13.45	86.08	13.53
水杨酸	LLOQ(12.5)	12.59 $\pm$ 0.52	100.70	4.11	12.48 $\pm$ 0.93	99.90	7.47
	LQC(75)	71.75 $\pm$ 2.11	95.67	2.94	72.90 $\pm$ 3.35	97.21	4.59
	MQC(300)	306.80 $\pm$ 2.79	102.27	0.90	306.87 $\pm$ 11.49	102.29	3.74
	HQC(500)	504.90 $\pm$ 14.09	100.98	2.79	509.46 $\pm$ 19.37	101.89	3.80
野黄芩苷	LLOQ(12.5)	12.34 $\pm$ 1.44	98.68	11.68	12.31 $\pm$ 1.80	98.55	14.60
	LQC(75)	70.47 $\pm$ 4.95	93.96	7.02	66.29 $\pm$ 6.79	88.40	10.24
	MQC(300)	272.20 $\pm$ 27.82	90.72	10.22	263.39 $\pm$ 26.14	87.79	9.92
	HQC(500)	493.60 $\pm$ 3.16	98.73	0.64	453.06 $\pm$ 49.49	90.61	10.92
芹菜素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	LLOQ(12.5)	12.73 $\pm$ 0.86	101.86	6.77	12.40 $\pm$ 0.74	99.22	5.90
	LQC(150)	151.70 $\pm$ 3.80	101.13	2.51	149.94 $\pm$ 6.83	99.96	4.50
	MQC(250)	237.50 $\pm$ 4.66	94.98	1.96	242.79 $\pm$ 8.76	97.12	3.60
	HQC(375)	391.60 $\pm$ 10.53	104.44	2.69	395.31 $\pm$ 10.08	105.01	2.60

表 4 提取回收率与基质效应
Table 4 Extraction recovery and matrix effect

成分 Component	浓度(标示值) Concentration/(μg/L)	提取回收率 Extraction recovery (RSD)/%	基质效应 Matrix effect (RSD)/%
丁香酸	LLOQ(5)	89.28(1.94)	97.19(1.64)
	LQC(30)	96.49(2.79)	81.01(1.79)
	MQC(120)	103.76(2.50)	93.00(1.70)
	HQC(200)	89.27(10.45)	133.87(7.87)
东莨菪亭	LLOQ(3)	99.01(2.66)	108.71(3.05)
	LQC(18)	96.83(2.69)	93.61(2.82)
	MQC(72)	105.71(5.43)	71.16(14.77)
	HQC(120)	103.97(14.71)	64.72(8.46)
芹菜素	LLOQ(3)	100.28(3.61)	153.60(14.49)
	LQC(18)	98.91(2.56)	119.04(7.40)
	MQC(72)	99.93(4.37)	171.20(7.87)
	HQC(120)	112.63(5.71)	117.17(9.34)
水杨酸	LLOQ(12.5)	100.31(2.83)	74.97(2.64)
	LQC(75)	95.54(1.25)	73.39(2.15)
	MQC(300)	101.52(0.82)	86.04(2.03)
	HQC(500)	80.77(1.62)	89.79(3.66)
野黄芩苷	LLOQ(12.5)	92.98(2.59)	87.94(6.70)
	LQC(75)	106.80(2.98)	83.29(6.10)
	MQC(300)	96.21(2.97)	88.92(5.10)
	HQC(500)	95.28(4.32)	81.39(9.20)
芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷	LLOQ(12.5)	86.95(4.87)	99.98(6.71)
	LQC(150)	89.69(1.57)	110.93(1.69)
	MQC(250)	107.18(2.09)	99.25(2.66)
	HQC(375)	90.68(3.97)	105.19(7.05)



注: —●—M 表示模型组; —▲—S 表示假手术组; a. 丁香酸; b. 东莨菪亭; c. 芹菜素; d. 水杨酸; e. 野黄芩苷; f. 芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷

图 3 VaD 模型组和假手术组大鼠的血药浓度-时间曲线

Fig. 3 Blood drug concentration-time curves of rats in VaD model group and sham operation group

表 5 灯盏细辛提取物入血原型成分药代动力学参数
Table 5 Pharmacokinetic parameters of prototype components of *Erigeron breviscapus* extract into blood

成分 Component	参数 Parameter	单位 Unit	模型组 Model group (M)	假手术组 Sham operation group (S)	M/S
丁香酸	AUC(0- <i>t</i>)	μg/(mL·h)	9788.65	15083.29	0.65
	AUC(0-∞)	μg/(mL·h)	13637.62	15845.82	
	<i>T</i> _{max}	h	0.083	0.19	
	<i>C</i> _{max}	μg/L	247.54	298.38	
东莨菪亭	AUC(0- <i>t</i>)	μg/(mL·h)	1488.72	3672.56	0.41
	AUC(0-∞)	μg/(mL·h)	2865.60	4539.79	
	<i>T</i> _{max}	h	0.083	0.08	
	<i>C</i> _{max}	μg/L	37.77	163.65	
芹菜素	AUC(0- <i>t</i>)	μg/(mL·h)	384.03	359.08	1.07
	AUC(0-∞)	μg/(mL·h)	1233.22	501.82	
	<i>T</i> _{max}	h	0.083	0.08	
	<i>C</i> _{max}	μg/L	18.01	29.45	
水杨酸	AUC(0- <i>t</i>)	μg/(mL·h)	72228.90	203536.79	0.35
	AUC(0-∞)	μg/(mL·h)	83965.29	213994.96	
	<i>T</i> _{max}	h	2.00	2.96	
	<i>C</i> _{max}	μg/L	687.94	1280.34	
野黄芩苷	AUC(0- <i>t</i>)	μg/(mL·h)	139286.49	213773.45	0.65
	AUC(0-∞)	μg/(mL·h)	155411.96	238851.98	
	<i>T</i> _{max}	h	2.21	0.50	
	<i>C</i> _{max}	μg/L	949.01	890.73	
芹菜素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	AUC(0- <i>t</i>)	μg/(mL·h)	26687.01	14870.85	1.79
	AUC(0-∞)	μg/(mL·h)	29586.33	15638.37	
	<i>T</i> _{max}	h	9.36	0.08	
	<i>C</i> _{max}	μg/L	85.10	115.15	

中, TNF 作为一种促炎细胞因子, 在 VaD 的慢性脑低灌注和缺血性损伤中显著升高, 其通过激活下游炎症通路促进星形胶质细胞和小胶质细胞的活化, 释放 IL-1β、IL-6 等炎症介质, 并引起神经炎症级联反应^[18-19]。研究发现, VaD 患者脑脊液中 TNF-α 水平高于阿尔茨海默病(AD)患者, 且与执行功能损害密切相关^[20], 抑制 TNF-α 可减少海马神经元凋亡并改善学习记忆能力^[21]。与关键靶点有关的代谢通路有: 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、阿尔兹海默病信号通路、抗原加工过程与递呈信号通路等。已有研究表明^[22-23], 在 VaD 发病过程中, MAPK 信号通路起重要作用, 该通路通过促进炎症反应调控海马神

经元突触的可塑性和调节海马神经元的凋亡, 促进 VaD 发展。MAPK 信号通路有 3 种亚型可能与 VaD 相关, 分别是 ERK1/2、JNK、P38α。其中, ERK1/2 通路在缺血初期短暂激活, 可促进神经元存活, 而持续激活可导致线粒体功能障碍和凋亡^[24-25]; JNK 通路增加 Aβ 生成酶表达和与外周免疫细胞浸润协同作用, 主导炎症反应与神经元凋亡^[26]; P38α 通路激活后可降解基底膜蛋白, 加重血脑屏障渗漏并抑制 VEGF 表达, 阻碍血管再生, 从而在 VaD 疾病发展中调控炎症反应和抑制血管重塑^[27-28]。野黄芩苷和芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷可作用于 MAPK 信号通路上的靶点, 从而对 VaD 产生治疗作用。

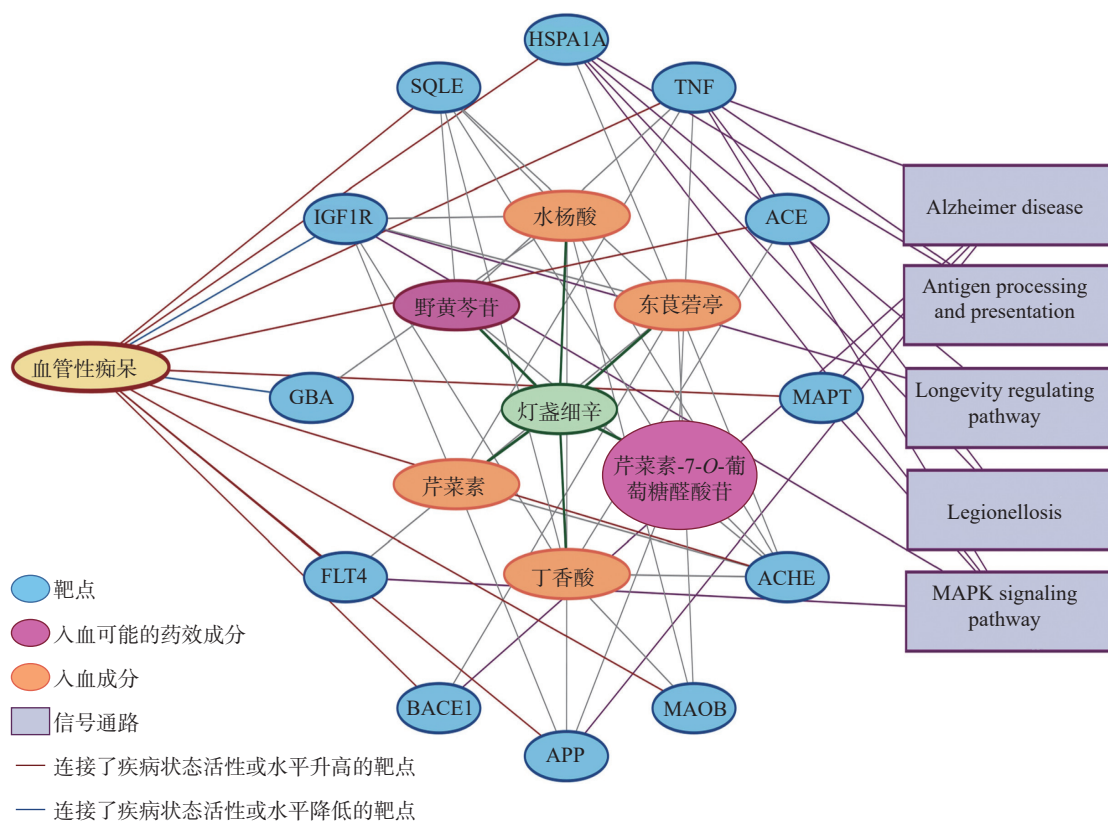


图4 灯盏细辛治疗VaD潜在靶点及代谢调控网络图

Fig. 4 Potential targets and metabolic regulatory network of *Erigeron breviscapus* for vascular dementia

3 结论

本研究采用UHPLC-Qtrap-MS/MS法对野黄芩苷、芹菜素、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷、水杨酸、东莨菪亭、丁香酸等6种灯盏细辛入血成分进行定量分析,该方法的灵敏度、专属性、线性、精密度、准确度、稳定性、基质效应及提取回收率均符合生物样本定量分析的要求。采用该方法对VaD大鼠及假手术组大鼠给药后的10个不同时间点血浆样本进行6种成分的定量分析。结果表明,与假手术组相比,VaD模型组中的丁香酸、野黄芩苷、东莨菪亭、水杨酸的体内暴露量降低,可能存在代谢加快或排泄增加;芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷在VaD模型组的体内暴露量高于假手术组;野黄芩苷、水杨酸、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷在VaD模型大鼠体内存在双峰吸收;灯盏细辛药效成分野黄芩苷的体内暴露量最高。通过网络药理学方法共筛选出12个灯盏细辛入血成分与VaD疾病的交集靶点,5条相关的信号通路,构建了入血成分-靶点-疾病-通路相互作用网络。本研究揭示了灯盏细辛入血

成分在生理状态和疾病状态下的代谢差异,为其药代动力学研究提供支持,同时为深入理解其作用机制提供参考。

致谢:感谢国家民委创新团队支持计划(民族医药研究创新团队:民族医药防治重大疾病药效物质基础及药理毒理评价研究)对本研究的支持。

参考文献:

- [1] O'BRIEN J T, THOMAS A. Vascular dementia[J]. *Lancet*, 2015, 386(10 004): 1 698-1 706.
- [2] O'BRIEN J T, ERKINJUNTTI T, REISBERG B, ROMAN G, SAWADA T, PANTONI L, BOWLER J V, BALLARD C, DeCARLI C, GORELICK P B, ROCKWOOD K, BURNS A, GAUTHIER S, DeKOSKY S T. Vascular cognitive impairment[J]. *The Lancet Neurology*, 2003, 2(2): 89-98.
- [3] IADECOLA C. The pathobiology of vascular dementia[J]. *Neuron*, 2013, 80(4): 844-866.
- [4] CALABRESE V, GIORDANO J, SIGNORILE A, ONTARIO M L, CASTORINA S, de PASQUALE C,

- ECKERT G, CALABRESE E J. Major pathogenic mechanisms in vascular dementia: roles of cellular stress response and hormesis in neuroprotection[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2016, 94(12): 1 588-1 603.
- [5] ALAM R, TRIPATHI M, MANSOORI N, PARVEEN S, LUTHRA K, LAKSHMY R, SHARMA S, ARULSELVI S, MUKHOPADHYAY A K. Synergistic epistasis of paraoxonase 1 (rs662 and rs85460) and apolipoprotein E4 genes in pathogenesis of Alzheimer's disease and vascular dementia[J]. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, 2014, 29(8): 769-776.
- [6] 郭欣, 林珊, 吴丽明, 田新慧. 灯盏细辛化学成分及药理作用研究进展[J]. *中成药*, 2019, 41(2): 393-402.
- GUO Xin, LIN Shan, WU Liming, TIAN Xinhui. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Erigeron Breviscapus*[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2019, 41(2): 393-402(in Chinese).
- [7] GUO L L, DENG J, WANG Y L, HUANG Y, GUAN Z Z. Influence of scutellarin on oxidative stress and neuronal apoptosis of rats with dementia[J]. *Zhong Yao Cai*, 2011, 34(2): 237-241.
- [8] 郭婷, 黎元元. 灯盏细辛注射液药理和毒理作用研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(18): 2 820-2 823.
- GUO Ting, LI Yuanyuan. Progresses on pharmacological and toxicological effects of Dengzhanxixin injection[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2012, 37(18): 2 820-2 823(in Chinese).
- [9] WU R, LIANG Y, XU M, FU K, ZHANG Y, WU L, WANG Z. Advances in chemical constituents, clinical applications, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology of erigeron breviscapus[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 656 335.
- [10] CHAI L, GUO H, LI H, WANG S, WANG Y L, SHI F, HU L M, LIU Y, ADAH D. Scutellarin and caffeic acid ester fraction, active components of Dengzhanxixin injection, upregulate neurotrophins synthesis and release in hypoxia/reoxygenation rat astrocytes[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 150(1): 100-107.
- [11] 郭欣. 灯盏细辛注射液化学成分及药代动力学研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- [12] 史金新. 灯盏细辛注射液中野黄芩苷的大鼠药代动力学研究[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2020.
- [13] XIE X, WANG F, GE W, MENG X, FAN L, ZHANG W, WANG Z, DING M, GU S, XING X, SUN X. Scutellarin attenuates oxidative stress and neuroinflammation in cerebral ischemia/reperfusion injury through PI3K/Akt-mediated Nrf2 signaling pathways[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2023, 957: 175 979.
- [14] SAKTHIVEL K M, VISHNUPRIYA S, PRIYA DHARSHINI L C, RASMI R R, RAMESH B. Modulation of multiple cellular signalling pathways as targets for anti-inflammatory and anti-tumorigenesis action of Scopoletin[J]. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2022, 74(2): 147-161.
- [15] SINGH V K, SAHOO D, AGRAHARI K, KHAN A, MUKHOPADHYAY P, CHANDA D, YADAV N P. Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-psoriatic potential of apigenin in RAW 264.7 cells, HaCaT cells and psoriasis like dermatitis in BALB/c mice[J]. *Life Sciences*, 2023, 328: 121 909.
- [16] DENG M, SUN J, PENG L, HUANG Y, JIANG W, WU S, ZHOU L, CHUNG S K, CHENG X. Scutellarin acts on the AR-NOX axis to remediate oxidative stress injury in a mouse model of cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Phytomedicine*, 2022, 103: 154 214.
- [17] GAO X Y, LI X Y, ZHANG C Y, BAI C Y. Scopoletin: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2024, 15: 1 268 464.
- [18] AN H, TAO W, LIANG Y, LI P, LI M, ZHANG X, CHEN K, WEI D, XIE D, ZHANG Z. Dengzhanxixin injection ameliorates cognitive impairment through a neuroprotective mechanism based on mitochondrial preservation in patients with acute ischemic stroke[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 712 436.
- [19] LI M, MENG N, GUO X, NIU X, ZHAO Z, WANG W, XIE X, LV P. DI-3-*n*-butylphthalide promotes remyelination and suppresses inflammation by regulating AMPK/SIRT1 and STAT3/NF- κ B signaling in chronic cerebral hypoperfusion[J]. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2020, 12: 137.
- [20] CHAN D K, SRINIVASAN V, UPTON C, CHEN X, ROMERO-ORTUNO R. The association between frailty and vascular dementia[J]. *Chinese Journal of Geriatrics*, 2015, 34(12): 1 293-1 299.
- [21] 陈英华, 孙忠人, 金弘, 洪霞, 姜磊, 秦瑞奇, 魏巍, 倪国忠. 针刺对血管性痴呆大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 及学习记忆能力的影响[J]. *针灸临床杂志*, 2013, 29(5): 56-60.
- CHEN Yinghua, SUN Zhongren, JIN Hong, HONG Xia, JIANG Lei, QIN Ruiqi, WEI Wei, NI Guozhong. Effects

- of acupuncture on the levels of TNF- α and IL-1 β in serum and on the learning and memory ability of vascular dementia rats[J]. *Journal of Clinical Acupuncture and Moxibustion*, 2013, 29(5): 56-60(in Chinese).
- [22] 陈欣悦, 边文超, 赵晴, 许卓. MAPK 信号通路在血管性痴呆中研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(5): 1 267-1 270.
- CHEN Xinyue, BIAN Wenchao, ZHAO Qing, XU Zhuo. Research progress of MAPK signaling pathway in vascular dementia[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2023, 43(5): 1 267-1 270(in Chinese).
- [23] CHEN H L, JIA W J, LI H E, HAN H, LI F, ZHANG X L N, LI J J, YUAN Y, WU C Y. Scutellarin exerts anti-inflammatory effects in activated microglia/brain macrophage in cerebral ischemia and in activated BV-2 microglia through regulation of MAPKs signaling pathway[J]. *Neuromolecular Medicine*, 2020, 22(2): 264-277.
- [24] YUAN Z, MO Y, LI D, XIE L, CHEN M. Inhibition of ERK downregulates autophagy via mitigating mitochondrial fragmentation to protect SH-SY5Y cells from OGD/R injury[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2023, 21(1): 204.
- [25] 杨洋, 刘晓楠, 马超, 姜源, 孙晓红. ERK1/2 信号传导通路在大鼠局灶性急性脑缺血再灌注中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(11): 987-992.
- YANG Yang, LIU Xiaonan, MA Chao, JIANG Yuan, SUN Xiaohong. The effect of ERK1/2 signal transduction pathway in rats focal acute ischemia-reperfusion[J]. *Chinese Journal of Arteriosclerosis*, 2013, 21(11): 987-992 (in Chinese).
- [26] 谢惠芳, 徐如祥, 魏继鹏, 刘振华, 姜晓丹. JAK2/STAT3 信号转导通路在缺血性脑损伤中作用机制的研究[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2008, 25(2): 135-138.
- XIE Huifang, XU Ruxiang, WEI Jipeng, WEI Jipeng, LIU Zhenhua, JIANG Xiaodan. The mechanisms of JAK2/STAT3 signal pathway in ischemic brain injury in rats[J]. *Journal of Apoplexy and Nervous Diseases*, 2008, 25(2): 135-138(in Chinese).
- [27] SINGH A A, YADAV D, KHAN F, SONG M. Indole-3-carbinol and its derivatives as neuroprotective modulators[J]. *Brain Sciences*, 2024, 14(7): 674.
- [28] FAN X, WU J, YANG H, YAN L, WANG S. Paeoniflorin blocks the proliferation of vascular smooth muscle cells induced by platelet-derived growth factor-BB through ROS mediated ERK1/2 and p38 signaling pathways[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 17(1): 1 676-1 682.
- (收稿日期: 2025-03-24; 修回日期: 2025-04-25)