

心脑苏颗粒（无糖型）中4种成分在大鼠血浆中的药动学行为

谢君¹, 蒋志涛¹, 王雪^{1,2}, 冯星月^{1,2}, 潘金火^{1,2}, 陈晓峰^{1*}

(1. 南京中医药大学附属张家港医院, 江苏省企业研究生工作站, 江苏 张家港 215600; 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023)

摘要: **目的** 考察心脑苏颗粒（无糖型）中4种成分在大鼠血浆中的药动学行为。**方法** 大鼠灌胃给予该药物0.5% CMC-Na 混悬液（3 g/kg）后取血, UHPLC-MS/MS 法测定血药浓度。然后, DAS2.0 软件计算药动学参数。**结果** 丹参酮Ⅱ_A、丹酚酸B、人参皂苷R_{g1}、三七皂苷R₁的血药浓度-时间曲线符合二室模型, 其 $t_{1/2}$ 分别为（1.68±0.56）、（4.13±0.87）、（3.62±0.87）、（9.77±3.12）h, T_{max} 分别为（0.51±0.19）、（1±0）、（6±0）、（4.00±1.09）h, C_{max} 分别为（0.42±0.08）、（0.17±0.02）、（0.46±0.11）、（0.41±0.12）mg/L。**结论** 心脑苏颗粒（无糖型）中4种成分的生物利用度均较高。

关键词: 心脑苏颗粒（无糖型）; 丹参酮Ⅱ_A; 丹酚酸B; 人参皂苷R_{g1}; 三七皂苷R₁; 药动学行为; 血浆; UHPLC-MS/MS

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2018)06-1283-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.06.011

Pharmacokinetic behaviors of four constituents in sugar-free Xinnaosu Granules in rat plasma

XIE Jun¹, JIANG Zhi-tao¹, WANG Xue^{1,2}, FENG Xing-yue^{1,2}, PAN Jin-huo^{1,2}, CHEN Xiao-feng^{1*}
(1. Jiangsu Provincial Enterprises Workstation for Graduate Students, Zhangjiagang Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Zhangjiagang 215600, China; 2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the pharmacokinetic behaviors of four constituents in sugar-free Xinnaosu Granules in rat plasma. **METHODS** Rats intragastrically administered with the 0.5% CMC-Na suspension of this drug (3 g/kg) had their blood collected for the determination of plasma concentration by UHPLC-MS/MS, after which pharmacokinetic parameters were calculated by DAS2.0 software. **RESULTS** The plasma concentration-time curves for tanshinone Ⅱ A, salvianolic acid B, ginsenoside R_{g1}, notoginsenoside R₁ accorded with two compartment model, with the $t_{1/2}$ values of (1.68±0.56), (4.13±0.87), (3.62±0.87), (9.77±3.12) h, T_{max} values of (0.51±0.19), (1±0), (6±0), (4.00±1.09) h, C_{max} values of (0.42±0.08), (0.17±0.02), (0.46±0.11), (0.41±0.12) mg/L, respectively. **CONCLUSION** All the four constituents in sugar-free Xinnaosu Granules demonstrate high bioavailabilities.

KEY WORDS: sugar-free Xinnaosu Granules; tanshinone Ⅱ A; salvianolic acid B; ginsenoside R_{g1}; notoginsenoside R₁; pharmacokinetic behaviors; plasma; UHPLC-MS/MS

心脑苏是南京中医药大学附属张家港医院名老中医在经典名方“补阳还五汤”的基础上, 结合临床实践形成的经验方, 原为水煎汤剂, 使用不便, 前期研究已将其优化成无糖型颗粒剂, 拟开发为医疗机构制剂。该方由丹参、三七、川芎、黄芪、红花等8味中药组成, 具有活血行气、化痰祛瘀、疏经活络、止痛之功效, 临床用于治疗脑动脉硬化、缺血性脑中风、脑出血造成的后遗症、心绞

收稿日期: 2017-09-06
基金项目: 苏州市科技计划项目 (SYSD2016179)
作者简介: 谢君 (1981—), 女, 主管药师, 从事中药药代动力学研究。E-mail: xj8100@sohu.com
* 通信作者: 陈晓峰 (1976—), 男, 副主任药师, 从事医院药学及药代动力学研究。Tel: 13776259887, E-mail: 516237405@qq.com

痛、冠心病等，可明显改善大鼠心肌缺血损伤，促进血管再生，对急性脑缺血和冠心病有良好的治疗作用^[1-5]。

丹参、三七及其活性成分抗血小板聚集、改善心肌缺血、保护脑组织的功效已被大量报道^[6-10]，丹参酮Ⅱ_A、丹酚酸 B、人参皂苷 R_{g1}、三七皂苷 R₁ 为两者有效成分，但中药复方强调整体药物效应，药效发挥依赖于多种有效成分之间的协调作用，故进行其给药后的整体药动力学研究尤为重要^[11]。本实验采用 UHPLC-MS/MS 法建立心脑血管颗粒（无糖型）中丹参酮Ⅱ_A、丹酚酸 B、人参皂苷 R_{g1}、三七皂苷 R₁ 在大鼠血浆中的含量，并对其药动力学特征进行研究，以期为进一步开展该药物配伍规律、临床应用的研究奠定基础。

1 材料

Agilent 1290 超高效液相色谱仪、Agilent 6430 LC-MS 三重四级杆质谱仪，配置电喷雾化离子源（ESI）、MassHunter 色谱工作站（美国安捷伦公司）；AE240 电子天平（梅特勒-托利多仪器上海有限公司）；MICRO-17R 冷冻离心机（美国 Thermo 公司）；WH-2 微型旋涡混合仪（上海沪西分析仪器厂）；Driect-Q5 超纯水机（美国 Millipore 公司）。

咖啡酸对照品（批号 PRF7102121）购自成都普瑞法科技开发有限公司；地高辛（批号 100015-201308）、三七皂苷 R₁（含量 94%，批号 110745-201318）、人参皂苷 R_{g1}（含量 95%，批号 110703-201529）、丹酚酸 B（含量 97%，批号 111562-201313）、丹参酮Ⅱ_A（含量 98%，批号 110766-201416）对照品均购自中国食品药品检定研究院。心脑血管颗粒（无糖型）由南京中医药大学附属张家港医院制剂室提供，批号 20170112。甲醇为色谱纯；乙酸胺为分析纯；水为超纯水。

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 8 只，由南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供，体质量（220 ± 20）g，合格证编号 SYXK（苏）2017-0001。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件 Phenomenex Gemini 色谱柱（2 mm × 100 mm，3 μm）；流动相甲醇-2 mmol/L 乙酸铵（65 : 35）；体积流量 200 mL/min；柱温 35 ℃；进样量 5 μL。离子化模式，正、负离子同时检测；定量模式多反应监测模式（MRM）；毛细管电压 4 000 V；干燥气温度 400 ℃。质谱参数见表 1。

表 1 各成分质谱参数					
Tab. 1 MS parameters for various constituents					
成分	离子化模式	母离子 m/z	子离子 m/z	裂解电 压/V	碰撞能 量/V
地高辛（内标）	[M + Na] ⁺	803.6	283.1	270	50
丹参酮Ⅱ _A	[M + H] ⁺	295.0	249.0	105	30
人参皂苷 R _{g1}	[M + Na] ⁺	823.5	643.5	260	40
三七皂苷 R ₁	[M + Na] ⁺	955.5	775.5	300	40
咖啡酸（内标）	[M-H] ⁻	178.9	134.9	85	20
丹酚酸 B	[M-H] ⁻	717.1	519.0	240	35

2.2 溶液制备 精密称取各对照品适量，置于 10 mL 量瓶中，甲醇溶解并稀释至刻度，制得含丹酚酸 B（1.032 mg/mL）、丹参酮Ⅱ_A（1.116 mg/mL）、三七皂苷 R₁（1.014 mg/mL）、人参皂苷 R_{g1}（1.044 mg/mL）的对照品贮备液，临用前稀释至 100 μg/mL 左右。再精密称取咖啡酸、地高辛对照品适量，甲醇配制成含两者质量浓度分别为 2、1.4 μg/mL 的内标工作液。

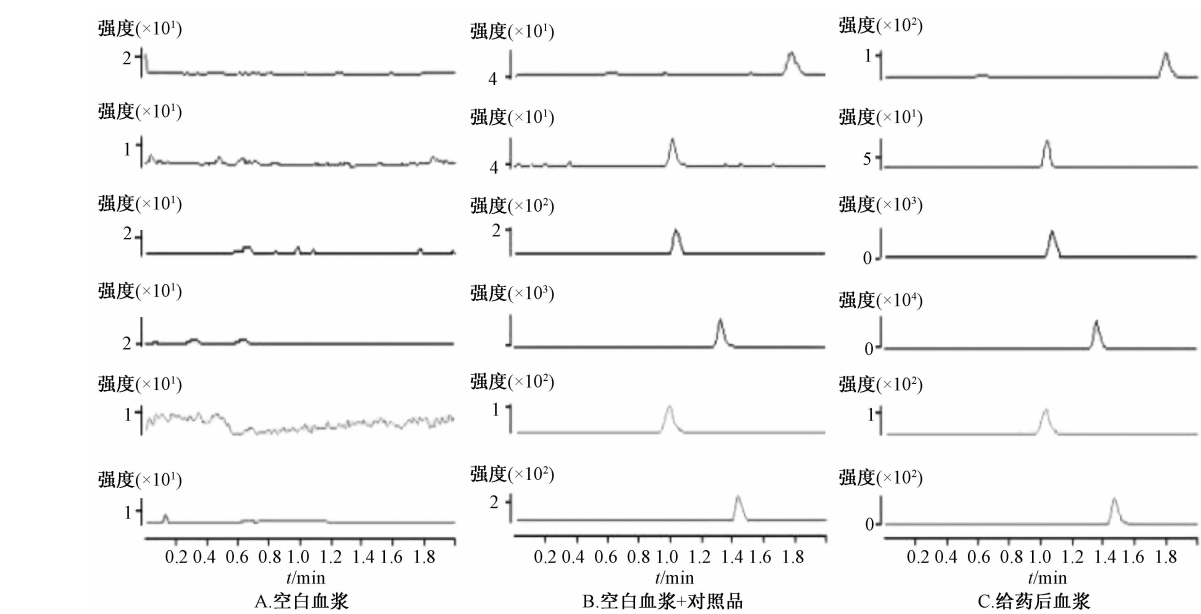
2.3 血浆样品处理 取血浆样品 100 μL，加入内标溶液 10 μL、甲醇 400 μL，涡旋振摇 3 min 后 12 000 r/min 离心 5 min，吸取上清液，40 ℃ 氮气吹干，100 μL 50% 甲醇复溶，12 000 r/min 离心 5 min，取 5 μL 上清液进样分析。

2.4 药代动力学设计 取大鼠 8 只，适应性饲养 1 周，自由饮食饮水。实验前禁食 12 h，自由饮水，按 3 g/kg 剂量灌胃给予心脑血管颗粒（无糖型）（0.5% CMC-Na 配制成混悬液），分别于给药后 0.083、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、4、6、8、12、24 h 眼眶静脉丛采血约 0.5 mL，置于肝素钠离心管中，4 000 r/min 离心 10 min，吸取血浆，置于 -20 ℃ 冰箱中冷冻保存。采用 DAS 2.0 软件，对所测血药浓度-时间数据进行处理。

2.5 方法学验证

2.5.1 专属性试验 取空白血浆、空白血浆加对照品、内标溶液、给药后血浆适量，按“2.3”项下方法处理，在“2.1”项条件下进样测定，结果见图 1。由图可知，4 种成分均能与内标完全分离，杂质和内源性物质无明显干扰，表明该方法专属性良好。

2.5.2 线性关系考察 精密吸取各成分对照品溶液适量，空白血浆配制成不同质量浓度，倍比稀释得到系列血浆样品，按“2.3”项下方法处理，在“2.1”项条件下进样测定。以待测物和内标的峰面积比值为纵坐标（Y），待测物质量浓度为横坐标（X）进行回归，根据 S/N > 10 计算最低定量限，结果见表 2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。



注：各图由上至下，均依次为丹参酮Ⅱ_A、三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、地高辛、咖啡酸、丹酚酸 B

图 1 各成分 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of various constituents

表 2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents				
成分	回归方程	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	r	最低定量限/(ng·mL ⁻¹)
丹参酮Ⅱ _A	$Y=0.513\ 2X-0.021$	2.0~640.0	0.994 6	2.0
丹酚酸 B	$Y=0.326\ 5X-0.000\ 5$	0.4~240.0	0.995 5	0.4
人参皂苷 R _{g1}	$Y=0.643\ 4X+0.003\ 4$	2.0~512.0	0.992 9	2.0
三七皂苷 R ₁	$Y=1.053\ 1X-0.003\ 4$	1.0~512.0	0.996 8	1.0

2.5.3 精密度和准确度试验 取大鼠空白血浆适量，加入对照品和内标，配制成含丹参酮Ⅱ_A（2、4、256、512 ng/L）、丹酚酸 B（0.4、0.8、80、180 ng/L）、三七皂苷 R₁（2、4、96、384 ng/L）、人参皂苷 R_{g1}（1、2、96、384 ng/L）最低定量限和低、中、高 3 个质量浓度的质量控制（QC）样品，按“2.3”项下方法处理，在“2.1”项条件下连续测定 3 d，测得 4 种成分日内 RSD 均小于 10.5%，日间 RSD 均小于 11.5%，准确度均在 93.8%~111.3% 之间，表明该方法准确可靠、重复性好。

2.5.4 回收率与基质效应 取空白血浆样品 100 μL，配制成“2.5.3”项下 QC 样品，按“2.3”项下方法处理，在“2.1”项条件下进样测定，得各成分峰面积 A；另取 100 μL，按“2.3”项下方法处理，蛋白沉淀离心后，上清液中加入对应质量浓度的对照品、内标溶液，同法操作，得峰面积 B；再取上述与 QC 样品质量浓度相同的对照品、内标溶液，按“2.3”项下方法处理，得峰面

积 C，以 A 与 B 的比值为提取回收率、B 与 C 的比值为基质效应进行计算，结果见表 3。

表 3 各成分回收率和基质效应（n=6）

Tab. 3 Recoveries and matrix effects of various constituents (n=6)			
成分	质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	基质效应/%	回收率/%
丹参酮Ⅱ _A	4	92.3	85.2
	256	94.6	88.1
	512	94.1	84.9
丹酚酸 B	0.8	101.1	92.4
	80	98.5	93.8
	180	99.4	95.4
三七皂苷 R ₁	4	105.5	100.4
	96	107.2	97.8
	384	104.9	98.5
人参皂苷 R _{g1}	2	90.5	92.5
	96	92.4	94.6
	384	94.7	96.8
咖啡酸	120	98.4	92.4
地高辛	260	94.6	95.6

2.5.5 稳定性试验 取“2.5.3”项下 QC 样品，按“2.3”项下方法处理，分别在 4 种条件下进行

稳定性试验：①室温下短时间放置后进样；②-20℃下反复冻融3次后进样；③按“2.3”项下方法处理后，于4℃进样器中静置24 h后进样；④样本置于-20℃下保存30 d后进样，平行6份。结果，4种成分在不同条件下的稳定性均良好，RSD均<11%。

2.6 药代动力学研究 血浆样品按“2.3”项下方法处理，在“2.1”项条件下进样测定，计算各时间点4种成分血药浓度，绘制血药浓度-时间曲线，结果见图2。再采用DAS 2.0软件计算药动学参数，并对药物在大鼠体内的药动力学过程进行拟合，发现各成分均符合二室模型，具体见表4。

表4 各成分药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Tab. 4 Pharmacokinetic parameters for various constituents ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	单位	丹参酮Ⅱ _A	丹酚酸B	人参皂苷R _{g1}	三七皂苷R ₁
$t_{1/2}$	h	1.68±0.56	4.13±0.87	3.62±0.87	9.77±3.12
V _d /F	L	0.95±0.15	0.095±0.017	0.06±0.01	0.003±0.0006
CL/F	L·h ⁻¹	3.04±0.91	1.85±0.22	2.84±0.53	2.51±0.95
AUC _{0-48 h}	mg·h·L ⁻¹	1.29±0.15	0.61±0.11	2.71±0.93	2.78±0.82
AUC _{0-∞}	mg·h·L ⁻¹	1.43±0.23	0.72±0.23	2.82±1.16	2.92±1.03
MRT _{0-48 h}	h	5.58±1.22	4.43±1.16	7.11±2.03	5.32±1.69
MRT _{0-∞}	h	5.72±1.35	4.54±1.23	7.35±2.28	5.42±1.86
T _{max}	h	0.51±0.19	1±0	6±0	4±1.09
C _{max}	mg·L ⁻¹	0.42±0.08	0.17±0.02	0.46±0.11	0.41±0.12

3 讨论

中药所含化学成分复杂繁多，有效成分含有量低，入血后血药浓度更低而难以检测，故研究中药复方在大鼠体内的药代动力学过程非常困难。本实验从成分含有量与药理活性2个方面同时进行考虑^[12-14]，选择了心脑血管中含有量较高的专属性成分丹酚酸B、丹参酮Ⅱ_A、人参皂苷R_{g1}、三七皂苷R₁作为研究对象。

首先，比较了乙腈、甲醇作为蛋白沉淀剂的效果，发现经甲醇沉淀后，所得峰形良好，无内源性物质干扰，样品基质效应小，可能是因为甲醇不仅起到沉淀蛋白的作用，同时还能较好地溶解待测成分及内标，从而起到一定提取作用，并降低血浆基质的影响^[15]。然后，还比较了蛋白沉淀后直接进样或经氮吹后复溶进样检测的响应值，发现氮吹后不仅响应值有所提高，而且可更有效地保护色谱柱。最终确定，将血样先用400 μL甲醇沉淀蛋白，氮吹后再用50%甲醇复溶。

本实验结果显示，大鼠灌胃心脑血管颗粒（无糖型）后，4种成分在大鼠体内的滞留时间均较长，生物利用度均较高，可以充分发挥药效。

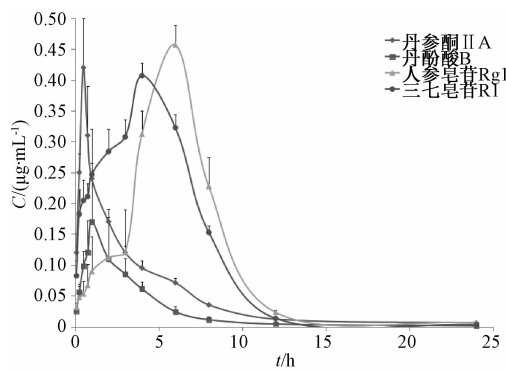


图2 各成分血药浓度-时间曲线
Fig. 2 Plasma concentration-time curves for various constituents

参考文献:

[1] 李姗姗, 张咏梅, 蒋志涛, 等. 星点设计-效应面法结合主成分分析法优选心脑血管颗粒醇提工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(4): 15-19.

[2] 汪铜芳, 张咏梅, 李姗姗, 等. 心脑血管颗粒成型工艺优选[J]. 世界中医药, 2017, 12(2): 411-413.

[3] 潘金火. 心脑血管提取物对花生四烯酸诱导大鼠急性脑缺血的治疗作用[J]. 成都中医药大学学报, 2010, 33(1): 65-68.

[4] 潘金火. 心脑血管提取物对豚鼠心脏冠脉流量的影响实验[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1535.

[5] 潘金火, 李姗姗, 任卫高, 等. 心脑血管提取物对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌缺血的保护作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(24): 132-136.

[6] 金玉青, 洪远林, 李建蕊, 等. 川芎的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药与临床, 2013, 4(3): 44-48.

[7] 蔡金坊, 代云桃, 肖永庆, 等. 系统评价蜜炙对黄芪药效物质基础的改变[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(8): 47-52.

[8] Yang P F, Song X Y, Chen N H. Advances in pharmacological studies of *Panax notoginseng* saponins on brain ischemia-reperfusion injury[J]. *Acta Pharm Sin*, 2016, 51(7): 1039-1040.

[9] 居乃香, 孙静. 三七药理作用的研究进展[J]. 北方药学, 2014, 11(11): 90-91.

[10] 马丙祥,董宠凯. 丹参的药理作用研究新进展[J]. 中国药房, 2014, 25(7): 663-665.

[11] 武洁,朱贺,吴军,等. HPLC-TQ-MS/MS测定加味败藤浸膏中6种有效成分的血药浓度及其药动学研究[J]. 中国药学杂志, 2017, 52(6): 473-479.

[12] 陈凯丽,易剑锋,梁辉. 中药复方药代动力学研究概况[J]. 宜春学院学报, 2015, 37(12): 18-21.

[13] 马浩玲,张德芹,丁丽琴,等. HPLC-MS/MS法同时测定大鼠血浆中山楂叶提取物3种黄酮类成分及其药代动力学研究[J]. 天津中医药, 2017, 34(4): 266-271.

[14] 林力,孙明谦,苗兰,等. 中药复方天龙通心在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 药学报, 2017, 52(4): 575-581.

[15] Liu X, Wang D, Zhang W J, et al. LC determination and pharmacokinetic study of vitexin-4"-O-glucoside in rat plasma after oral administration [J]. Nat Prod Res, 2011, 26(10): 962-967.

三七总皂苷缓释片处方的优化

张琳^{1,2}, 赵凤平¹, 张传辉², 闫丹¹, 江敏瑜¹, 杨荣平³, 王云红^{2*}, 裴太蓉^{2*}
(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137; 2. 重庆市中药研究院, 重庆 400065; 3. 西南大学, 重庆 400715)

摘要: **目的** 优化三七总皂苷缓释片处方。**方法** 以制剂成型性为指标, 三元相图初步筛选载体材料和填充剂用量; 以辅料用量为影响因素, 药物累积释放度综合评分为评价指标, Box-Behnken 响应面法优化处方。**结果** 最佳载体材料为羟丙基甲基纤维素 (HPMC_{K15M}), 最佳填充剂为淀粉、微晶纤维素 (MCC), 最佳处方为 HPMC_{K15M} 用量40.5 mg, 淀粉用量 17 mg, MCC 用量 94 mg, 药物累积释放度综合评分 96.54%。缓释片的释放符合 Higuchi 模型, 释药过程以扩散为主, 兼有溶蚀, 各时间点累积释放度符合缓释制剂要求。**结论** 该方法稳定可行, 可用于优化三七总皂苷缓释片处方。

关键词: 三七; 总皂苷; 缓释片; 处方; 三元相图; Box-Behnken 响应面法

中图分类号: R944 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)06-1287-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.06.012

Formulation optimization for the sustained-release tablets of *Panax notoginseng* total saponins

ZHANG Lin^{1,2}, ZHAO Feng-ping¹, ZHANG Chuan-hui², YAN Dan¹, JIANG Min-yu¹,
YANG Rong-ping³, WANG Yun-hong^{2*}, PEI Tai-rong^{2*}

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Chongqing Municipal Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China; 3. Southwest University, Chongqing 400715, China)

KEY WORDS: *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen; total saponins; sustained-release tablets; formulation; ternary phase diagram; Box-Behnken response surface method

三七为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根及根茎, 其主要有效成分为皂苷^[1-3]。现代药理研究表明, 三七具有抗心肌缺血、抗心律失常的作用, 用于治疗心

收稿日期: 2017-09-01

基金项目: 重庆市“121”科技支撑示范工程 (cstc2014fzktjcsf10016)

作者简介: 张琳 (1994—), 女, 硕士生, 研究方向为中药制剂新剂型和新技术。Tel: 18883364982, E-mail: 1677790721@qq.com

* 通信作者: 王云红 (1985—), 女, 硕士, 副研究员, 从事中药新制剂质量标准研究。Tel: 13527474723, E-mail: 271981966@qq.com

裴太蓉 (1965—), 女, 副主任中药师, 从事中药新剂型质量标准研究。Tel: 13618382296, E-mail: 2421133701@qq.com