

· 药物代谢 ·

冠心Ⅱ号方不同组分配伍对丹参素、阿魏酸在犬体内药代动力学的影响

吕锡亮¹, 李寅超^{2*}, 何永侠², 谷艳², 彭娟³, 范斌³

(1. 河南省职工医院, 郑州 450002; 2. 郑州大学药学院, 郑州 450001;
3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**比较冠心Ⅱ号方不同配伍组丹参素、阿魏酸的药代动力学,揭示不同配伍对两成分体内过程的影响规律。**方法:**Beagle犬灌服冠心Ⅱ号各配伍方:①全方有效组分重组方;②全方中活血药有效组分重组方;③全方中理气药有效组分重组方;④全方中丹参有效组分;⑤全方中川芎有效组分。应用液-质联用(LC-MS/MS)法检测犬血浆中丹参素、阿魏酸含量,利用药代动力学软件DAS 2.0计算药代动力学参数,并比较组间差异。**结果:**与含丹参的其他两组比较,全方有效组分丹参素的峰浓度(C_{max})和药-时曲线下面积(AUC)有增高趋势;与含川芎的其他两组比较,全方有效组分重组方阿魏酸的清除率(CL)有降低趋势,表观分布容积(V)有增高趋势,但均无统计学意义。**结论:**Beagle犬灌服冠心Ⅱ号有效组分不同配伍对药效成分丹参素和阿魏酸的药代动力学过程基本一致。

[关键词] 冠心Ⅱ号; 药代动力学; 配伍; 丹参素; 阿魏酸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0164-05

[doi] 10.11653/syfy2013140164

Study on Pharmacokinetics of Ferulic Acid and Danshensu in Guanxin II by Combination with Different Drugs

LV Xi-liang¹, LI Yin-chao^{2*}, HE Yong-xia², GU Yan², PENG Juan³, FAN Bin³

(1. Worker's Hospital of He'nan Province Hospital, Zhengzhou 450002, China;

2. Pharmaceutical Department of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To compare pharmacokinetics of danshensu (DSS) and ferulic acid (FA) in different combinations to Guanxin II, and to reveal the effect of the combination to Guanxin II on the process *in vivo* of the two main effective components. **Method:** Beagle dogs were administrated orally with Guanxin II in combination with different drugs: total extraction recombination, part extraction recombination propitious to blood, danshen extraction recombination, part extraction recombination propitious to breath, ligusticum wallichii extraction recombination. The plasma concentration of DSS and FA were assayed by LC-MS/MS after administration. the pharmacokinetic parameters were estimated by DAS 2.0 phamacokinetic software edited by SUN Rui-yuan, and then to compare pharmacokinetic parameters within different groups by statistic software SPSS 10.0. **Result:** The statistic results have showed that the pharmacokinetics of combination with different drugs to Guanxin II have no significant difference, but the tendency. **Conclusion:** The process of danshensu and ferulic acid *in vivo* (Beagle dogs) are not significantly different.

[Key words] Guanxin II; pharmacokinetics; combination; danshensu; ferulic acid

[收稿日期] 20130102(003)

[第一作者] 吕锡亮, 副主任医师, 从事临床药学研究, Tel:13703983333, E-mail:lvxiliang0403@sina.com

[通讯作者] * 李寅超, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事新药药理与毒理研究, Tel:0371-67732202, E-mail:lych.hi@163.com

方剂配伍规律是中医药理论的特色和精华,但也是中医药现代化研究的难点所在^[1]。近年来,采用经典方剂中有效组分配伍优化设计,借助体内药代动力学研究手段,揭示方剂配伍规律及科学内涵,已成为中药创新研究的一种新模式。冠心Ⅱ号又称精制冠心病片或精制冠心颗粒,由2010年版《中国药典》一部^[2]收录,该方由丹参、川芎、红花、赤芍、降香5味中药按6:3:3:3:2比例组成。方中丹参、赤芍、红花重于补血、养血、活血,川芎、降香重于行气、理气,全方共奏“活血化瘀、理气止痛”之功效^[3]。本课题组比较药效学结果表明,全方有效组分重组方的疗效优于方中活血药和理气药有效组分重组方^[4-6]。复方药效的发挥离不开其发挥药效的物质基础,而这些物质基础发挥药效的时效关系如何,其在体内的药代动力学过程是否与配伍有相关性,为解决以上问题,本研究拟通过对冠心Ⅱ号多种组方配伍的药代动力学的比较研究加以阐释。

1 材料

1.1 动物 健康 Beagle 犬,7~8个月龄,体重8~12 kg,雌雄兼用,购自军事医学科学院实验动物中心,实验动物生产许可证号 SCXK-(军)2007-004。

1.2 受试药 丹参有效组分、赤芍有效组分、红花有效组分、川芎有效组分、降香有效组分,均由中国中医科学院中药研究所提供,批号20090118。

冠心Ⅱ号全方有效组分重组复方、活血药有效组分重组复方和理气药有效组分重组复方的制备:将冠心Ⅱ号方中各药材生药量的比例,按照各药材有效组分的提取收率,折算成有效组分提取物的比例(丹参-川芎-赤芍-红花-降香0.388:0.055:0.199:0.327:0.488)。按照该比例,将5味药材的有效组分混合均匀,即得冠心Ⅱ号全方有效组分的重组复方;将丹参、赤芍和红花有效组分混合均匀,即得活血药有效组分重组复方;将川芎、降香有效组分混合均匀,即得理气药有效组分重组复方。

1.3 试剂 丹参素钠对照品(批号110855-200809)、阿魏酸对照品(批号110773-200611),均由中国药品生物制品检定所提供;维生素C(批号A7506-25G,试剂级,Sigma-Aldrich上海贸易有限公司);丙酮、乙酸乙酯为分析纯;甲酸、甲醇、乙腈均为HPLC级。

1.4 仪器 Agilent1200 6410 QQQ LC-MS分析系统,超纯水处理器(Sartorius),BT25S电子分析天平(Sartorius),IKA MS3 basic 四周振荡器,Anke TGL-

16G离心机,DC-12H恒温水浴锅-氮吹仪(Anpel)。

2 方法

2.1 动物处理 健康比格犬10只,分为5组(给药量均按生药量计),每组2只:①全方有效组分重组方 $4.00\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;②方中活血药有效组分重组方 $2.82\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;③理气药有效组分重组方 $1.18\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;④丹参有效组分 $1.41\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;⑤川芎有效组分 $0.71\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。其中,②~⑤组的剂量均由①组折算得来。按照拉丁方实验设计,采用循环交叉给药法,共给药6次,每次给药时均交换组别,每次给药均间隔3周。给药前16 h禁食不禁水。给药前及给药后5,10,20,30,45,60,75,90,120,150,210,270,360,480,600 min分别由前肢静脉采血2 mL,肝素抗凝。于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,分离上清血浆。

2.2 血样浓度测定

2.2.1 液-质联用条件 液相条件:ZORBAX Eclipse plus C_{18} 色谱柱($2.1\text{ mm}\times 10\text{ mm},1.8\text{ }\mu\text{m}$);QQQ检测器;流动相水-乙腈83:17;流速 $0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;柱温 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$;柱压(64 ± 5)bar。进样量 $5\text{ }\mu\text{L}$ 。

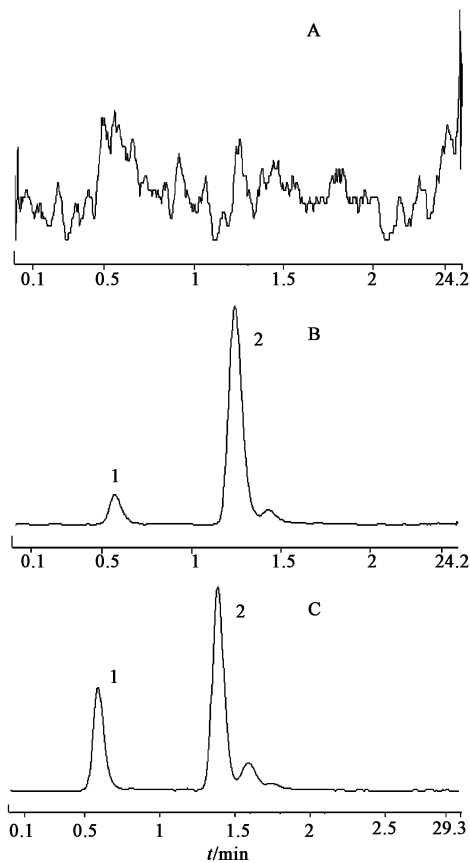
质谱条件:电离源为电喷雾负离子模式,多反应检测。干燥气(氮气)温度 $350\text{ }^{\circ}\text{C}$;干燥气流速 $11\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$;雾化气(氮气)压力40 psi;毛细管电压 $4\ 000\text{ V}$ 。阿魏酸:毛细管出口电压(fragmentor)95 V;碰撞能量(CE)10 V; m/z 193→134;丹参素钠:毛细管出口电压(fragmentor)90 V;碰撞能量(CE)20 V; m/z :197.1→135。

2.2.2 血样处理 参照文献方法^[7-9],加以适当改进。精密吸取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的血浆,加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的维生素C水溶液,加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 甲酸-丙酮-水4:140:56溶液,再加乙酸乙酯1 mL。充分涡旋混合1 min,离心($16\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)2 min,取上清 $1\ 000\text{ }\mu\text{L}$,于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴下氮气吹干,残渣加流动相 $100\text{ }\mu\text{L}$ 复溶,离心($16\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)2 min,再经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 有机滤膜过滤,上清液直接上机测定。

2.3 药代动力学参数分析 绘制药-时曲线,以DAS 2.0计算药动学参数(统计矩参数):药-时曲线下面积 $\text{AUC}_{(0\rightarrow t)}$ 、体内平均滞留时间 $\text{MRT}_{(0\rightarrow t)}$ 、半衰期 $t_{1/2}$ 、清除率CL,表观分布容积 V ,达峰浓度 C_{max} ,达峰时间 T_{max} ,并用统计学软件SPSS 10.0比较组间参数差异。

3 结果

3.1 色谱分离 在上述色谱条件下,丹参素、阿魏酸与血浆内源峰以及冠心Ⅱ号方中其他入血成分峰分离良好。结果见图1。



1. 丹参素, 2. 阿魏酸;

A. Beagle 犬给药前空白血浆样品的总离子色谱;

B. 含有阿魏酸和丹参素混合对照品的犬血浆样品的总离子色谱;

C. Beagle 犬灌胃冠心 II 号全方有效组分重组复方
4 g 生药/kg 后 5 min 血浆样品的总离子色谱

图 1 丹参素、阿魏酸及血浆样品总离子色谱

3.2 方法学考察

3.2.1 线性关系考察及检测限 在犬空白血浆中, 分别加入系列浓度的丹参素钠和阿魏酸混合对照品, 使丹参素钠的浓度分别为 7.82, 15.64, 31.28, 62.56, 125.13, 250.25, 500.5, 1 001 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 阿魏酸

的浓度分别为 9.38, 18.75, 37.5, 75, 150, 300, 600, 1 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。按照 2.2.2 血样处理项下的操作, 对血样进行处理和测定。结果丹参素在 7.82 ~ 1 001 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性关系良好, 其浓度与峰面积的回归方程为 $Y = 3.56X + 40.81$ (Y 为峰面积, X 为浓度; $r = 0.9902$); 阿魏酸在 9.37 ~ 1 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性关系良好, 其浓度与峰面积的回归方程为 $Y = 19.62X - 110.02$ (Y 为峰面积, X 为浓度; $r = 0.9890$)。按信噪比为 3 计, 血浆中丹参素钠和阿魏酸的最低检测质量浓度分别为 7.82, 9.37 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.2.2 提取回收率 结果显示, 丹参素高、中、低 3 个浓度的血浆样品提取回收率均在 90% 以上; 阿魏酸高、中、低 3 个浓度的血浆样品提取回收率均在 20% ~ 35%, 提取率较稳定, 能满足试验要求。

3.2.3 精密度 阿魏酸和丹参素高、中、低浓度的血浆样品在 1 日内重复 4 次测定的日内精密度 RSD 均 < 15%; 由于每次样品测定时, 均随行标准曲线, 故未考察日间精密度。

3.3 丹参素的药代动力学过程 Beagle 犬灌服冠心 II 号不同组方后 150min, 各组丹参素药-时曲线渐趋平衡, 但并未完全消除; 与活血药有效组分重组方和丹参有效组分比较, 全方有效组分重组方丹参素的 C_{max} , $\text{AUC}_{(0-t)}$ 有增高趋势, 但采用单因素方差分析, 全方有效组分重组方的丹参素药动学参数与以上两方均无显著性差异。各组犬血浆中药物浓度与时间关系及各参数统计结果见表 1 及图 2。

3.4 阿魏酸的药代动力学过程 Beagle 犬灌服冠心 II 号不同组方后, 各配伍组阿魏酸 600 min 内已基本消除; 与全方中理气药有效组分重组方和川芎有效组分相比, 全方有效组分重组方的 C_{max} 呈增高趋势, CLz/F 呈降低趋势; 但 3 种配伍方中阿魏酸的药动学参数均无显著性差异。见图 3 及表 2。

表 1 Beagle 犬灌服冠心 II 号全方有效组分重组方、方中活血药有效组分重组方和方中丹参有效组分重组方后丹参素在血浆中的药代动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

药动参数	全方有效组分重组复方	活血药有效组分重组复方	丹参有效组分重组
	/4.00 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	/2.82 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	/1.41 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
$C_{\text{max}}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	261.1 \pm 410.3	96.0 \pm 55.2	106.4 \pm 48.5
$T_{\text{max}}/\text{min}$	82.92 \pm 93.72	91.25 \pm 126.08	54.58 \pm 28.24
$\text{AUC}_{(0-t)}/\text{min}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	32 041 \pm 14 099	27 683 \pm 17 999	27 275 \pm 11 152
$T_{1/2}/\text{min}$	813 \pm 853	1 291 \pm 1 748	984 \pm 1 251
$\text{CLz}/F/\text{mL}\cdot\text{min}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.068 \pm 0.062	0.194 \pm 0.438	0.065 \pm 0.025
$V_z/F/\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$	57.20 \pm 44.09	69.96 \pm 59.60	75.08 \pm 72.20
$\text{MRT}_{(0-t)}/\text{min}$	224.4 \pm 74.6	259.0 \pm 74.9	272.2 \pm 30.8

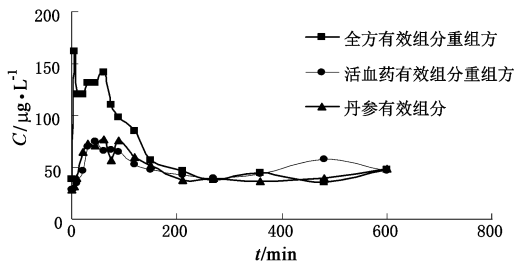


图2 Beagle 犬灌胃冠心 II 号全方有效组分重组方、活血药有效组分重组方和丹参有效组分后丹参素的药-时曲线

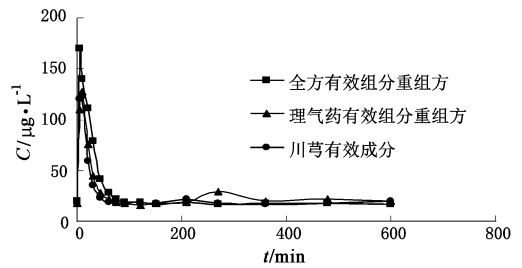


图3 Beagle 犬灌胃冠心 II 号全方有效组分重组方、理气药有效组分重组方、川芎有效成分阿魏酸后平均药-时曲线

表2 Beagle 犬灌服冠心 II 号全方有效组分重组方、方中理气药有效组分重组方和方中川芎有效组分后阿魏酸在血浆中的药代动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

药动参数	全方有效组分重组复方 $/4.00 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$	理气药有效组分重组复方 $/1.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$	川芎有效组分 $/0.71 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$
$C_{max} / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	196.4 ± 180.5	151.6 ± 114.8	156.8 ± 96.5
T_{max} / min	10.83 ± 8.21	9.17 ± 5.57	11.25 ± 7.11
$\text{AUC} / \text{min} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$12\ 583 \pm 5\ 898$	$12\ 467 \pm 7\ 182$	$11\ 168 \pm 5\ 711$
$t_{1/2} / \text{min}$	$7\ 580 \pm 14\ 393$	$9\ 171 \pm 16\ 737$	$11\ 198 \pm 19\ 105$
$\text{CLz} / \text{F} / \text{mL} \cdot \text{min} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.072 ± 0.243	0.18 ± 0.33	0.20 ± 0.32
$V_z / \text{F} / \text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$	488.3 ± 336.2	221.4 ± 171.9	220.0 ± 144.9
$\text{MRT}_{(0-t)} / \text{min}$	183.4 ± 98.0	193.4 ± 101.7	206.8 ± 90.8

4 讨论

方剂配伍是中医用药的精髓,是中医药理论的灵魂,揭示复方配伍规律也是目前制约中医药发展的关键环节。中药复方配伍规律的研究,已经历了从饮片到成分、从体外到体内、从体内化学成分到药代动力学方面研究的过程。

由于中药复方成分复杂,仅用复方中的某几个化学成分的药代动力学过程很难反映该复方的体内情况,这就要求找出一个或几个能反映复方整体的代表性成分。近年来,有人^[10]提出“药代 marker”和“构-代”的概念,为研究中药复方成分群的体内代谢勾勒出一种可行的探索方法,而如何确定“药代 marker”,如何利用“构-代”对体内复方中所有可能的有效成分或“活性分子群”进行药代动力学过程作出全面、准确的评价,仍是中药复方研究中的难题。

本实验从药代动力学角度,以冠心 II 号不同配伍方灌胃 Beagle 犬,检测药效成分丹参素和阿魏酸的药代动力学过程组间是否有差异。以往文献报道^[11-12]在测定含丹参素或阿魏酸的生物样品时,尚未见采用同一样品处理方法和同一测定条件对二者同时定量。本研究采取抗氧化、避光等措施,探索出

能同时检测 2 种成分的生物样品处理方法,降低了检测限、减少了实验繁琐度。

结果表明,各配伍组的药代动力学过程一致。即冠心 II 号的配伍差异,从丹参素和阿魏酸的药代动力学过程上未能得到反映,那么其他药效成分的体内过程是否会随有效组分配伍的变化而变化?而有效组分配伍又能否阐释传统汤剂不同药材的配伍?这将是课题组待解决的问题。

[参考文献]

- [1] 陈学习,郑燕慧,施荣枫.方剂配伍规律现代研究思考与展望[J].中国当代医药,2010,17(7):6.
- [2] 中国药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:1213.
- [3] 李连达,靖雨珍.中医药研究[M].北京:科学技术文献出版社,2001:349.
- [4] 高会丽,李贻奎,仝燕,等.冠心 II 号系列组方对犬急性心肌梗死的治疗作用的比较研究[J].中药药理与临床,2007,23(5):1.
- [5] 高会丽,李贻奎,仝燕,等.冠心 II 号系列组方对家兔血小板聚集的影响[J].中国中医基础医学杂志,2008,14(5):345.

UPLC-MS-MS 同时测定比格犬血浆中阿魏酸、 香草酸、芍药苷和芍药内酯苷的含量及其药动学研究

罗年翠¹, 王川², 钱大玮^{1*}, 段金殿¹, 唐于平¹, 郭建明¹, 丁雯¹

(1. 南京中医药大学江苏省方剂高技术研究重点实验室, 南京 210046;

2. 中国药科大学药学院, 南京 211198)

[摘要] 目的: 建立利用超高效液相质谱联用色谱(UPLC-MS-MS)同时测定比格犬血浆中阿魏酸、香草酸、芍药苷和芍药内酯苷的分析方法, 并研究比格犬灌胃当归-白芍药对提取物后以上 4 种成分的药动学特征。方法: 采集比格犬灌胃当归-白芍药对提取物后不同时间点的血浆样本, 甲醇沉淀蛋白, 色谱采用 Waters BEH C₁₈ 反相柱, 流动相为水(含 0.1% 的甲酸)-乙腈梯度洗脱, 采用电喷雾离子化三重四极杆串联质谱, 以多反应监测(MRM)方式进行检测。正离子条件下用于定量分析的离子对分别为 m/z 195.3 ~ 144.5 (阿魏酸)、 m/z 169.0 ~ 92.9 (香草酸)、 m/z 481.3 ~ 197.1 (芍药内酯苷), 负离子条件下用于定量分析的离子对为 m/z 525.4 ~ 449.2 (芍药苷)。DAS 2.0 软件计算主要药动学参数。结果: 阿魏酸、香草酸、芍药苷和芍药内酯苷分别在 1.13 ~ 1 089, 1.23 ~ 1 080, 0.82 ~ 787.5, 0.36 ~ 337.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性关系良好, 样品提取回收率、精密度、准确度及稳定性等均符合要求。阿魏酸和香草酸 2 种酚酸类成分在比格犬体内吸收均较迅速, 阿魏酸消除较快, 香草酸消除相对较慢; 芍药苷和芍药内酯苷 2 种单萜苷类成分药动学特征相似, 在比格犬体内吸收和消除均较慢。结论: UPLC-MS-MS 法选择性好、灵敏度高、专属性强, 可用于当归-白芍药对中主要化学成分的体内药动学研究, 为当归-白芍配伍研究提供一定科学依据。

[关键词] 当归; 白芍; 阿魏酸; 香草酸; 芍药苷; 芍药内酯苷; 药动学; 超高效液相质谱联用色谱

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0168-06

[doi] 10.11653/syfyj2013140168

Simultaneous Determination of Ferulic Acid, Vanillic Acid, Peoniflorin and Albiflorin in Beagle Plasma and Pharmacokinetics by UPLC-MS-MS

LUO Nian-cui¹, WANG Chuan², QIAN Da-wei^{1*}, DUAN Jin-ao¹,
TANG Yu-ping¹, GUO Jian-ming¹, DING Wen¹

(1. Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of Traditional Chinese Medicine Formulae,

[收稿日期] 20120929(003)

[基金项目] 江苏省高校自然科学基金重大基础研究项目(10KJA360039); 国家科技支撑计划项目(2008BAI51B01)

[第一作者] 罗年翠, 硕士, 从事生物药剂学研究, Tel: 13770673226, E-mail: luoniancui000@126.com

[通讯作者] * 钱大玮, 研究员, 从事中药质量控制与生物药剂学研究, Tel: 025-85811916, Fax: 025-85811916, E-mail: Qianwj@126.com

- [6] 高会丽, 李贻奎, 全燕, 等. 冠心 II 号系列组方对大鼠心肌梗死的实验研究[J]. 陕西中医, 2008, 29(2): 231.
- [7] 黄敬群, 黄熙, 张莉, 等. 测定人血清中阿魏酸浓度的改进方法[J]. 中草药, 2002, 33(9): 792.
- [8] 陈国广, 孟蕾, 王永禄, 等. 当归补血汤中阿魏酸的药物流动力学研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(5): 744.
- [9] 甘洪全, 梅其炳, 屈扬, 等. 冠心 II 号煎剂的质量研究[J]. 中国药房, 2005, 16(22): 1695.
- [10] Chuan Li. Plasma & urinary tanshinol, PK markers for cardiotonic pills. 2008, doi: 10.1124/dmd.108.021592.
- [11] 陈平, 路通, 吴伯通, 等. 应用液相色谱-质谱联用技术检测血浆样品中丹参酚酸类成分的浓度[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12(7): 748.
- [12] 甘洪全, 屈扬, 梅其炳, 等. 冠心 II 号不同配伍对丹参素血药浓度的影响[J]. 中国药房, 2009, 20(6): 404.

[责任编辑 聂淑琴]