

冠心Ⅱ号方不同制备方法对丹参素、阿魏酸在犬体内药代动力学的影响

李寅超^{1*}, 周甜¹, 孙曼¹, 陈慧芳¹, 吴翠萍¹, 谷艳¹, 彭娟², 范斌²
(1. 郑州大学药学院, 郑州 450001; 2. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700)

〔摘要〕 目的:研究冠心Ⅱ号方不同制备方法对主要有效成分丹参素、阿魏酸在犬体内药代动力学过程的影响。方法:比格犬分别灌服冠心Ⅱ号全方汤剂(全方混煎制备)和全方有效组分重组复方(全方中各药材有效组分提取物的混合),应用液相色谱-质谱/质谱联用的方法(LC-MS/MS),检测药前及药后不同时间点时血浆中丹参素和阿魏酸的含量。利用药代动力学软件计算药代动力学参数,并进行组间比较。结果:对于丹参素,全方汤剂组达峰浓度($C_{\max}$)和药时曲线下面积(AUC)均显著高于全方有效组分重组复方组(均 $P<0.05$),达峰时间($T_{\max}$)和清除半衰期($t_{1/2}$)与全方有效组分重组复方组无显著性差异;而对于阿魏酸,则全方汤剂组的 $C_{\max}$ 显著低于全方有效组分重组复方组($P<0.05$), $T_{\max}$ 较全方有效组分重组复方组显著延长(均 $P<0.05$),AUC和 $t_{1/2}$ 与全方有效组分重组复方组比无统计学差异。结论:冠心Ⅱ号全方汤剂的丹参素入血浓度高、生物利用度高,但阿魏酸入血浓度低、达峰时间长,生物利用度低。即冠心Ⅱ号不同制备方法对方中不同有效成分药代动力学过程的影响不同,应结合药效学指标确定最佳制备方法。

〔关键词〕 冠心Ⅱ号; 药代动力学; 制备方法; 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(2012)03-0117-05

Study on Pharmacokinetics of Ferulic Acid and Danshensu in Guanxin Formula II by Different Preparation

LI Yin-chao^{1*}, ZHOU Tian¹, SUN Man¹, CHEN Hui-feng¹, WU Cui-ping¹, GU Yan¹, PENG Juan², FAN Bin²
(1. Pharmaceutical Department of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;
2. Center for Experiment of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To study the influence of different preparation methods on the pharmacokinetics of main effective components in Guanxin formula II. **Method:** Beagle dogs were administrated orally with Guanxin formula II and extracted effective components formula, respectively. The plasma concentrations of danshensu and ferulic acid were assayed by LC-MS/MS after administration. The pharmacokinetic parameters were estimated by DAS2.0 pharmacokinetics software edited by SunRuiyuan, and then compared within different groups by statistic software SPSS 10.0. **Result:** As for danshensu, the $C_{\max}$ and AUC of Guanxin formula II were significantly higher than the extracted effective components formula, with $P<0.05$, while $T_{\max}$ and $t_{1/2}$ possessed no significant difference. But for ferulic acid, the $C_{\max}$ of the former was significantly lower, while AUC and $t_{1/2}$ with no statistic difference. **Conclusion:** The blood concentration and bioavailability of danshensu in Guanxin formular II were higher, but for ferulic acid, they were significantly lower, which indicates that different preparation methods had different impacts on pharmacokinetics, and its parameters should be used to determine the best preparation method.

〔Key words〕 Guanxin formular II; pharmacokinetics; preparation method; danshensu; ferulic acid

冠心Ⅱ号方是治疗冠心病的经典名方,由丹参、川芎、红花、赤芍、降香 5 味中药组成^[1]。方中的丹

〔收稿日期〕 20110715(001)
〔通讯作者〕 * 李寅超,博士,副教授,硕士生导师,从事中药药理与毒理学研究,Tel:0371-67732202,E-mail:lych. hi@ 163. com

参、赤芍补血养血,红花活血化瘀,降香理气活血,川芎为血中气药,全方共奏“活血化瘀,理气止痛”之功效。前期研究结果表明^[2-4],冠心Ⅱ号不同制备方法对药效学有显著影响:全方汤剂(全方混煎制备)的疗效优于全方有效组分重组复方(全方中各药材有效组分提取物的混合)。本研究拟进一步从药代动力学的角度,揭示不同制备方法对冠心Ⅱ号方中主要有效成分药代动力学过程的影响,从而为冠心Ⅱ号改进制备工艺、提高疗效提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物 健康比格犬,7~8 个月龄,体重 8~12 kg,雌雄兼用,实验动物生产许可证号 SCXK-(军)2007-004。

1.2 药品与试剂

1.2.1 受试药 冠心Ⅱ号全方汤剂的制备:按照冠心Ⅱ号方中各药材比例(丹参-川芎-赤芍-红花-降香=6:3:3:3:1.8)称取各药材,混合后加 5 倍量水,浸泡 30 min,武火加热至药液沸腾,改为文火保持微沸 20 min,滤过,药渣再加水 3.3 倍量,武火加热至沸腾,文火保持微沸 15 min,滤过,合并 2 次煎液,离心、浓缩至每 1 mL 含生药 1.8 g 后,无菌灌装,4℃冰箱保存备用。

冠心Ⅱ号全方有效组分重组复方的制备:分别制备冠心Ⅱ号复方中各味药材的有效组分提取物。根据各药材有效组分提取物的收率,计算冠心Ⅱ号方中各药材生药量的比例相当于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,将各味药材的有效组分提取物混合均匀,即得冠心Ⅱ号全方有效组分的重组复方。

冠心Ⅱ号方中各味药材有效组分提取物的制备:丹参、川芎、赤芍和红花的有效组分提取物,均采用水提取、大孔吸附树脂精制、喷雾干燥的方法制备。降香的有效组分提取物采用水蒸气蒸馏法提取挥发油、并用 β -环糊精包裹制得。丹参、川芎、赤芍、红花和降香的 1 g 提取物分别相当于相应生药材的 15.46,54.42,15.09,9.17 g。以上受试药均由中国中医科学院中药研究所提供。

1.2.2 试剂 丹参素钠对照品(批号 110855),阿魏酸对照品(批号 110773),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,购于 Sigma-Aldrich 上海贸易有限公司;丙酮、乙酸乙酯均为分析纯;甲酸、甲醇、乙腈均为 HPLC 级。

1.3 仪器 Agilent 1200+6410 QQQ LC/MS 分析

系统,Sartorius 超纯水处理器,Sartorius BT25S 电子分析天平,IKA MS3 basic 四周振荡器,Anke TGL-16G 离心机,Anpel DC-12H 恒温水浴锅-氮吹仪。

1.4 液-质联用条件

1.4.1 液相条件 ZORBAX Eclipse plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×10 mm,1.8 μ m);检测器三重四极杆质谱检测器(QQQ),流动相水-乙腈(83:17),流速 0.3 mL·min⁻¹,柱温 35℃,进样量 5 μ L。

1.4.2 质谱条件 电离源为电喷雾负离子模式,多反应(MRM 模式)检测。干燥气(氮气)温度 350℃,干燥气流速 11 L·min⁻¹,雾化气(氮气)压力 40 psi,毛细管电压 4 000 V。检测阿魏酸时,毛细管出口电压 95 V,碰撞能量(CE)10 V,质荷比(m/z),193→134。检测丹参素时,毛细管出口电压 90 V,CE20 V, m/z 197.1→135。

1.5 给药方案和采血时间 健康比格犬 4 只,分为全方汤剂组和全方有效组分重组复方组,每组 2 只。ig 给药,给药剂量均为含生药 4.0 g·kg⁻¹,给药体积均为 2.2 mL·kg⁻¹。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。药前及药后 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,按 20 mL·L⁻¹加入 1 250 U·mL⁻¹的肝素钠生理盐水溶液,抗凝。全血肝素抗凝后,于 4℃,3 000 r·min⁻¹离心 10 min,分离上清,得抗凝血浆。置-70℃冷冻保存至测定。

1.6 血样处理 参照文献方法^[5-7],加以适当改进。精密吸取 100 μ L 的血浆,加入 10 μ L 8 g·L⁻¹的维生素 C 水溶液,加入 200 μ 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 r·min⁻¹)2 min,取上清 1 000 μ L,于 30℃水浴下氮气吹干,残渣加流动相 100 μ L 复溶,离心(16 000 r·min⁻¹)2 min,再经 0.22 μ m 有机滤膜过滤,上清液直接上机测定。

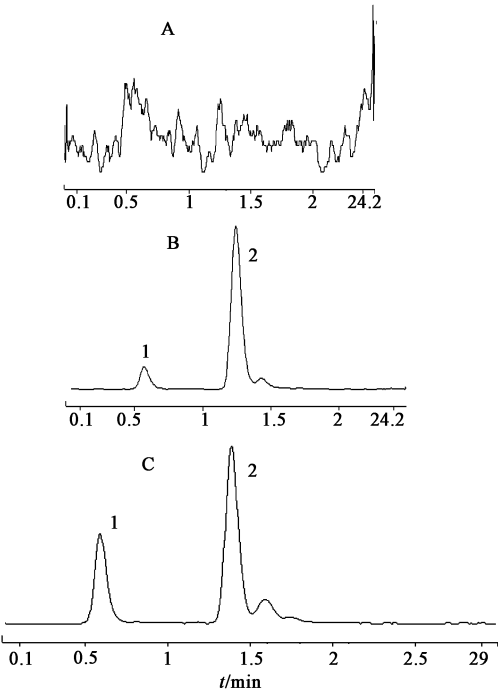
1.7 药动学参数分析 应用 DAS2.0 药动力学软件,计算主要药动学参数: $C_{\max}$, $T_{\max}$,AUC_(0→t)和 $t_{1/2}$ 应用 SPSS 10.0 统计学软件进行数据处理。

2 结果

2.1 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。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性考察及检测限胃内给药 丹参素在



A. 给药前的空白血浆样品;B. 含有阿魏酸和丹参素混合对照品的血浆样品;C. ig 冠心Ⅱ号全方有效组分重组方 4 g·kg⁻¹后 5 min 时的血浆样品;1. 丹参素;2. 阿魏酸

图 1 比格犬血浆样品的总离子色谱图

7.82~1 001 μg·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; $r = 0.990\ 2$);阿魏酸在 9.37~1 200 μg·L⁻¹ 线性关系良好,其浓度与峰面积的回归方程为 $Y = 19.62\ X - 110.02$ (Y 为峰面积, X 为浓度; $r = 0.989$)。按信噪比为 3 计,确定血浆中丹参素钠和阿魏酸的最低检测浓度分别为 7.82,9.37 μg·L⁻¹,满足实验要求。

2.2.2 回收率 丹参素或阿魏酸高、中、低浓度的血浆样品,方法回收率均在 80% 以上,满足试验要求。见表 1,2。

表 1 丹参素回收率($\bar{x} \pm s, n = 5$)

质量浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	测定质量浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率 /%	RSD /%
31.3	27.3 ± 3.4	87.2	12.32
125.1	115.6 ± 5.3	92.4	4.58
500.5	473.3 ± 16.0	94.6	3.38

表 2 阿魏酸回收率($\bar{x} \pm s, n = 5$)

质量浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	测定质量浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率 /%	RSD /%
37.5	31.3 ± 3.1	83.5	9.80
150	136.3 ± 6.9	90.9	5.06
600	587.0 ± 21.0	97.8	3.57

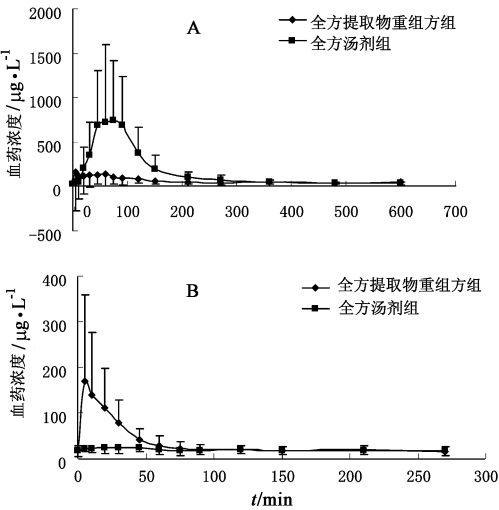
2.2.3 精密度 结果显示,丹参素和阿魏酸高、中、

低浓度的血浆样品在日内重复 4 次测定的相对标准偏差(RSD)均小于 10%,重复 4 日测定的 RSD 均小于 15%。表明测定方法基本稳定,满足实验要求(表 3)。

表 3 丹参素和阿魏酸的日内精密度和日间精密度($n = 4$)

测定物质	质量浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	日内精密度		日间精密度	
		峰面积	RSD/%	峰面积	RSD/%
丹参素	31.3	152 ± 11	7.3	135 ± 14.1	9.7
	125.1	386 ± 9	2.3	319 ± 13.7	7.8
	1 001	2 909 ± 95	3.3	2 881 ± 100.3	11.6
阿魏酸	37.5	943 ± 82	8.6	896 ± 103.0	11.8
	150	1 885 ± 99	5.2	1 912 ± 105.1	7.0
	1 200	15 267 ± 1 950	1.3	18 225 ± 1 247.4	13.4

2.3 药代动力学过程 比格犬灌服冠心Ⅱ号全方汤剂和全方有效组分重组复方后,丹参素和阿魏酸的血药浓度-时间曲线见图 2 和表 4。对于丹参素,全方汤剂组达峰浓度(C_{max})和药时曲线下面积(AUC)均显著高于全方有效组分重组复方组(均 $P < 0.05$),达峰时间(T_{max})和清除半衰期($t_{1/2}$)与全方有效组分重组复方组无显著性差异;而对于阿魏酸,则全方汤剂组的 C_{max} 显著低于全方有效组分重组复方组($P < 0.05$), T_{max} 较全方有效组分重组复方组显著延长(均 $P < 0.05$),AUC 和 $t_{1/2}$ 与全方有效组分重组复方组相比无统计学差异。



A. 丹参素平均药-时曲线;B. 阿魏酸平均药-时曲线

图 2 比格犬灌服不同方法制备的冠心Ⅱ号方后血浆中丹参素和阿魏酸的平均药时曲线

提示,冠心Ⅱ号全方汤剂的丹参素入血浓度高、生物利用度高,但阿魏酸入血浓度低、达峰时间长、生物利用度低。

表 4 比格犬灌服不同方法制备的冠心Ⅱ号方后丹参素和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	全方汤剂/4 g 生药/kg		全方有效组分重组复方/4 g 生药/kg	
	丹参素	阿魏酸	丹参素	阿魏酸
$C_{\max}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	989.0 ± 824.4 ¹⁾	31.45 ± 10.02 ¹⁾	261.1 ± 410.3	196.4 ± 180.6
$T_{\max}/\text{min}$	75.0 ± 20.2	32.08 ± 30.49 ¹⁾	82.92 ± 93.72	10.83 ± 8.21
$\text{AUC}/\text{min}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	96 215 ± 60 118 ¹⁾	9 676 ± 5 826	32 041 ± 14 099	12 583 ± 5 898
$t_{1/2}/\text{min}$	10 845 ± 11 432	1 068 ± 2 395	7 580 ± 14 393	813 ± 853

注:与全方有效组分重组组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

近年来,中药复方的有效组分重组方是药学研究者的研究热点,也是今后的一个发展方向,但是并无直接证据证实有效组分组方的疗效最好,组方最合理,大量工作都是从化学成分的角度间接证明有效组分组方最佳。因此,本课题组前期对不同方法制备的冠心Ⅱ号以及冠心Ⅱ号方的不同配伍方案进行了大量药效学的比较研究,结果^[2-4,8-9]表明:冠心Ⅱ号全方微米制剂与全方汤剂的疗效最佳,全方有效组分重组复方的疗效次之,方中活血药(丹参、赤芍、红花)和方中理气药(降香、川芎)的疗效则最弱。因此对于冠心Ⅱ号方,从有效成分的角度来看,冠心Ⅱ号全方的不同制剂疗效排序为:全成分制剂(全方微米制剂) > 次全成分制剂(全方水煎剂) > 部分成分制剂(全方有效组分重组方);从方药配伍的角度来看,冠心Ⅱ号不同配伍的疗效排序为:全方配伍(全方有效组分重组复方) > 半方配伍(活血药有效组分重组复方、理气药有效组分重组复方)。即,对于配伍方案和制备方法,有效成分保留越全疗效越好。

而对于冠心Ⅱ号方不同制备方法导致的药效不同,归根结底缘于他们入血药效成分种类和浓度的差异。因此本研究从药代动力学角度,进一步考察了不同制备方法对主要有效成分丹参素、阿魏酸在犬体内药代动力学过程的影响。结果表明,冠心Ⅱ号全方汤剂的丹参素入血浓度高、生物利用度高,但阿魏酸入血浓度低、达峰时间长,生物利用度低。因

此认为,冠心Ⅱ号不同制备方法对方中不同有效成分药代动力学过程的影响不同,应进一步结合药效学指标确定最佳制备方法。

[参考文献]

[1] 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.

[2] 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,2007,5:1.

[3] 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.

[4] 高会丽,李贻奎,仝燕,等. 冠心Ⅱ号系列组方对大鼠急性心肌梗死的实验研究[J]. 陕西中医,2008,29(2):231.

[5] 黄敬群,黄熙,张莉,等. RP-HPLC 测定人血清中阿魏酸浓度的改进方法[J]. 中草药,2002,33(9):792.

[6] 陈国广,孟蕾,王永禄,等. 当归补血汤中阿魏酸的药物动力学研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(5):744.

[7] 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.

[8] 张金艳,李贻奎,赵乐,等. 冠心Ⅱ号不同组分配伍对体外血栓形成、血小板聚集和镇痛作用的影响[J]. 中药药理与临床. 2010,26(1):1.

[9] 张金艳,李贻奎,赵乐,等. 冠心Ⅱ号不同组分配伍对大鼠急性心肌梗死的影响[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(2):153.

[责任编辑 聂淑琴]

· 药理 ·

抑郁症模型大鼠皮质、海马 cAMP 通路的信号表达
及颐脑解郁方的干预作用

田青, 唐启盛*, 赵瑞珍, 李小黎
(北京中医药大学第三附属医院, 北京 100029)

[摘要] 目的:观察抑郁大鼠模型脑内环磷酸腺苷(cAMP)通路的表达及中药颐脑解郁方的干预作用。方法:Wistar 大鼠分为正常组、模型组、中药颐脑解郁方组、西药氟西汀组。模型组、中药颐脑解郁方组、西药氟西汀组在 21 d 内采用慢性不可预见的温和性应激加孤养法(method of chronic unpredictable mild stress with isolated support)建立抑郁状态大鼠模型,模型组 ig 双蒸水,中药治疗组、西药对照组分别 ig 中药颐脑解郁方(6.2 g·kg⁻¹)、西药氟西汀(剂量 2.33 mg·kg⁻¹),采用 RT-PCR 实验方法,测定 PDE4(3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase)、CREB(cAMP response element binding protein)在抑郁模型大鼠脑内左前额叶皮质、海马的表达。结果:模型组大鼠大脑额叶皮质及海马 PDE4 表达增强($P < 0.05$),CREB 表达明显低于正常组($P < 0.05$, $P < 0.01$);中药颐脑解郁方及西药氟西汀干预后,额叶前侧皮质及海马 PDE4 的表达较模型组有明显的降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。CREB 表达明显增高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:中药颐脑解郁方干预后可明显调节 PDE4 及 CREB 在抑郁大鼠脑内的表达,提示中药颐脑解郁方的抗抑郁作用可能与调节 cAMP 信号转导通路有关。

[关键词] 抑郁症;动物模型;环磷酸腺苷通路;颐脑解郁方

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)03-0121-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20111202.1024.004 [网络出版时间] 2011-12-02 10:24

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20111202.1024.004.html>

Effect of Yinao Jieyu Prescription on cAMP Signaling Pathway
in Cortex and Hippocampus of Rats with Depression

TIAN Qing, TANG Qi-sheng*, ZHAO Rui-zhen, LI Xiao-li
(Beijing University of Traditional Chinese Medicine Third Hospital, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To study expression of brain cydic adenosine monophosphate(cAMP) pathway and intervention by Chinese medicine Yinao Jieyu prescription in depression rat model. **Method:** Depression model was established by method of Chronic unpredictable mild stress with isolated support, the expression of PDE4(3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase) and cAMP response element binding protein(CREB) was assayed by (PCR), in the rat brain model of depression left frontal cortex, hippocampus of the brain. **Result:** The hippocampus, prefrontal cortexand PDE4 were significantly higher than the normal group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), CREB expression was significantly lower than normal group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Chinese side Yinao Jieyu significantly after intervention in the brain regulated the expression of PDE4 and CREB ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Yinao Jieyu prescription can regulate the expression of PDE4 and CREB in rat depression model, which may be related to regulating cAMP pathway.

[Key words] depression; animal model; cydic adinosine monophosphatec pathway; Yinao Jieyu prescription

[收稿日期] 20110504(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973740);北京中医药大学自主选题项目(JYBZZ-JS077)

[第一作者] 田青,主治医师,医学博士,从事神经系统疾病的临床及研究,Tel:010-52075438,E-mail:tianqing010@sina.com

[通讯作者] *唐启盛,医学博士,主任医师,教授,博士生导师,从事中医脑病的临床及研究,E-mail:tangqisheng@263.net