

[制剂]

生脉拆方注射液中人参皂苷 Rb₁ 药代动力学研究

李国信, 夏素霞, 甘雨, 唐思, 张世良, 张宏
(辽宁省中医药研究院, 辽宁沈阳 110034)

关键词: 生脉注射液; 拆方; 人参皂苷 Rb₁; 药代动力学; 液相色谱-质谱联用法

摘要: 目的: 研究生脉拆方系列注射液人参皂苷 Rb₁ 在 Beagle 犬体内的药代动力学。方法: 采用拉丁方实验设计和交叉试验, 应用 LC/MS/MS 分析方法测定 Beagle 犬血浆中人参皂苷 Rb₁ 浓度, 并用 DAS ver 2.1 软件计算其药代动力学参数。结果: 人参皂苷 Rb₁ 线性范围为 0.002 36 ~ 9.45 μg/L, 方法回收率在 73.31% ~ 100.12%, 日内、日间 RSD 值均小于 15%。4 种生脉拆方注射液(生脉、参麦、参味、红参注射液) 中人参皂苷 Rb₁ 药代动力学参数 $t_{1/2}$ 如下: (45.63 ± 11.85)、(40.48 ± 11.76)、(32.31 ± 12.60) 和 (28.37 ± 8.87)h。结论: 该法简便、灵敏、特异, 适用于血浆中人参皂苷 Rb₁ 浓度测定; 4 种注射液中人参皂苷 Rb₁ 在 Beagle 犬体内药代动力学行为均符合三房室模型; 复方与单方注射液的人参皂苷 Rb₁ 的 $t_{1/2}$ 有显著性差异 ($P < 0.05$), 表明复方配伍影响其在体内药代动力学行为, 显示了药物间相互作用。

中图分类号: R969.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-1528(2011)02-0236-05

Pharmacokinetics of ginsenoside Rb₁ in Shengmai Injection and its dissected prescription

LI Guo-xin, XIA Su-xia, GAN Yu, TANG Si, ZHANG Shi-liang, ZHANG Hong

(Laboratory of Clinical Pharmacology, Academy of Traditional Chinese Medicine of Liaoning Province, Shenyang 110034, China)

KEY WORDS: Shengmai Injection; separate components; ginsenoside Rb₁; pharmacokinetic; LC-MS/MS

ABSTRACT: AIM: To study the pharmacokinetics of ginsenoside Rb₁ after iv of Shengmai Injection (*Panax ginseng*, *Ophiopogon japonicus*; *Schisandra chinensis*) and its dissected prescription in healthy Beagle Dog. **METHODS:** Latin square experimental design with dose, cross-test. The concentrations of plasma samples collected from the Beagle Dogs were determined by LC-MS/MS. The pharmacokinetic parameters were calculated by DAS ver 2.1 software. **RESULTS:** Ginsenosides Rb₁ linear range fell within 0.002 36 - 9.45 μg/L, The recovery was 73.31% - 100.12%. Days, day RSDs were less than 15%. The pharmacokinetic parameters of ginsenoside Rb₁ of 4 kinds of the dissected prescription (Shengmai, *Panax ginseng* + *Ophiopogon japonicus*; *Panax ginseng* + *Schisandra chinensis* and *Panax ginseng*) were as follows: $t_{1/2}$ were (45.63 ± 11.85), (40.48 ± 11.76), (32.31 ± 12.60) and (28.37 ± 8.87) h, respectively. **CONCLUSION:** The method for determining the concentrations of ginsenosides Rb₁ is simple, quick, not interfering, and suitable for the measure of ginsenoside Rb₁. Plasma concentration of ginsenoside Rb₁ in the Beagle dog pharmacokinetics is fitted with the three-compartment model. Pharmacokinetic parameters $t_{1/2}$ between groups have significant difference ($P < 0.05$), and show that there are drug interactions.

中药复方是中医药防治疾病的重要形式, 拆方研究是中药复方研究的重要内容, 拆方研究有助于阐明中药复方配伍组成原理及作用机制^[1], 为提高

中药质量和指导临床用药提供科学依据。本实验从药代动力学角度对生脉拆方注射液进行研究。生脉注射液是以金代李东垣《内外伤辨惑论》中生脉散

收稿日期: 2010-05-20

基金项目: 辽宁省教育厅资助项目 (20060532)

作者简介: 李国信 (1963 -), 男, 主任医师, 博士, 硕士研究生导师, 研究方向: 临床药理学。Tel: (024) 86803306 E-mail: syyljdlgx024@126.com

* 通讯作者: 夏素霞, 女, 研究员, 研究方向: 临床药理学。Tel: (024) 86803043 E-mail: xiasuxiazfq@163.com

为基本方制成的注射液,由人参、麦冬、五味子组成,有益气生津、复脉固脱之效。目前对生脉注射液人参皂苷 Rg₁、Re 药代动力学研究较多,而对人参皂苷 Rb₁ 报道较少,本实验对生脉拆方注射液中有效成分之一人参皂苷 Rb₁ 进行药动学研究。具文献报道^[2-6] 生脉注射液中人参皂苷 Rb₁ 研究,多数都是高效液相色谱测定方法使用紫外检测器或荧光检测器,使用 LC-MS/MS 检测报道少,而且此方法灵敏度高,血浆中内源性物质没有干扰,适合血浆样品检测。为此本研究利用 LC-MS/MS 建立测定比格犬血浆中人参皂苷 Rb₁ 浓度方法,从药动学角度探讨中药复方配伍规律。

1 材料与方法

1.1 仪器 美国安捷伦公司 Agilent6410 型 LC-MS/MS 联用仪,ESI 离子源,Quantitative Analysis version B. 1. 04 数据处理系统;XW-80A 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂);XS105 分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);SIGMA3-48k 低温高速离心机(德国 SIGMA 公司)。

1.2 试药制备与试剂

实验制剂:1. 生脉注射液:红参 100 g、麦冬 312 g、五味子 156 g;2. 参麦注射液:红参 100 g、麦冬 312 g;3. 参味注射液:红参 100 g、五味子 156 g;4. 红参注射液:红参 312 g,将上述制剂均制备成 1 000 mL 注射液,本院自制。

人参皂苷 Rb₁ 对照品,批号:110704-200420,中国药品生物制品检定所;内标:地西洋,批号:171225-200302,中国药品生物制品检定所。乙腈,色谱纯,德国 Merck 公司;水为娃哈哈纯净水,杭州娃哈哈集团有限公司。

1.3 实验动物 选用健康 Beagle 犬 7 只,体质量(6~9)kg。购自大连医科大学实验动物中心,许可证号:SCXK(辽)2008-0002。饲养于辽宁省中医药研究院实验动物中心,许可证号:SYXK(辽)2007-0010,以普通饲料喂养,自由饮水进食,适应性喂养一周。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件 色谱柱为安捷伦公司生产 ZORBAX SB-C₁₈ 柱(3.5 μm, 2.1 mm × 30 mm);流动相为水(A):乙腈(B):0~5 min (B:15→35);5~18 min (B:35);18~23 min (B:35→100);23~25

min (B:100),流量 0.3 mL/min;柱温:40 °C;进样量:10 μL。

质谱条件:ESI 离子源;Gas Flow 9 L/mL, Gas Temp 350 °C, Nebulizer 40psi, Capillary 4 000 V;正离子方式检测,扫描方式为选择反应监测(SIM),用于定量的离子为人参皂苷 Rb₁:母离子 *m/z* 为 1 131.5, Fragmentor 为 350;内标地西洋:母离子 *m/z* 为 285.0, Fragmentor 165;扫描时间为 200 ms。

2.2 血浆样本的处理 精密量取血浆 200 μL 置于 2 mL 空白离心管中,加入地西洋内标溶液(0.027 5 mg/L) 10 μL,涡旋混匀 30 s,加入乙腈 390 μL,旋涡混匀 3 min;14 000 r/min 离心 10 min,提取上层液, N₂ 气吹干后,加流动相 100 μL,涡旋 1 min, 14 000 r/min 离心 5 min,取上清液 10 μL 进样分析。

2.3 动物实验 采用拉丁方实验设计方法给药。Beagle 犬禁食 12 h(自由饮水)后,分别将 4 种注射液按 1.6 mL/kg 剂量,加入 250 mL 0.9% 氯化钠注射液稀释后备用,静脉滴注 1 h 滴完,给药后 2 h 可适量饮水,8 h 后统一进食。分别于给药前(0 h)和给药后 0.33、0.5、0.67、1、1.33、1.67、2、2.5、3、4、5、6、8、12、24、48、72、96、144 h 前肢静脉采血 3 mL,肝素抗凝,3 000 r/min 离心 10 min,分离血浆,置于 -70 °C 冰箱保存,待测。清洗两周后,进行交叉试验,方法同上。

2.4 结果

2.4.1 专属性 分别取空白血浆、空白血浆加人参皂苷 Rb₁ 以及内标地西洋对照品(漩涡器混合 30 s)、血浆样本,按 2.2 项下操作,取上清液 10 μL 进样分析,得如下色谱图 1。血浆杂质不干扰人参皂苷 Rb₁ 与内标地西洋含量测定。说明本法具有较高的专属性。人参皂苷 Rb₁ 与内标保留时间 *t_R* 分别为 8.3 min 和 10.1 min 左右。

2.4.2 线性范围和检测限 分别精密称取 7.56 mg 的人参皂苷 Rb₁ 和 11.00 mg 的地西洋对照品置于 2 个不同的 10 mL 量瓶中,用乙腈溶解并定容至刻度,即分别配制成 0.756 g/L 人参皂苷 Rb₁ 和 1.10 g/L 地西洋贮备液。分别精密量取人参皂苷 Rb₁ 和地西洋对照品贮备液适量,用乙腈稀释制成一系列人参皂苷 Rb₁ 浓度的应用液和 0.027 5 mg/L 内标溶液。

分别精密量取不同浓度的人参皂苷 Rb₁ 标准溶

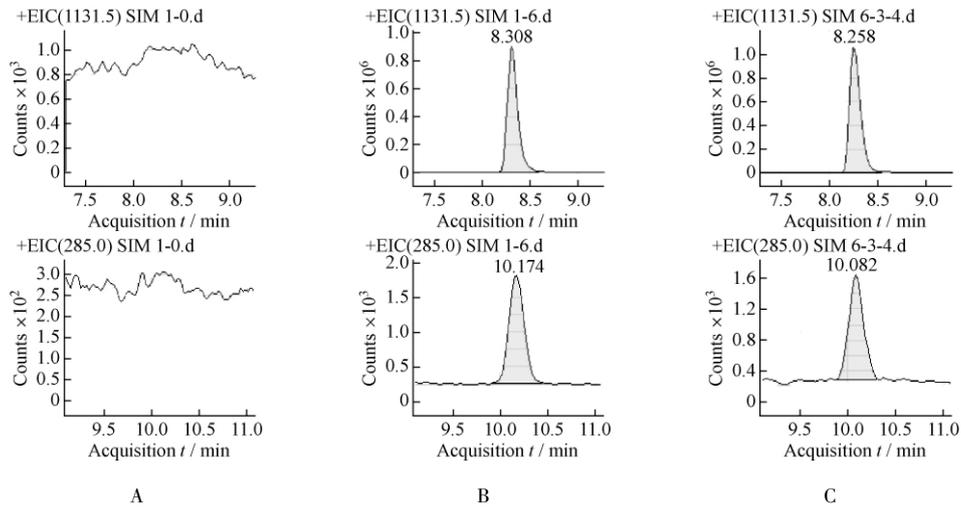


图1 人参皂苷 Rb₁ LC-MS/MS 色谱图

A. 空白血浆 B. 加入人参皂苷 Rb₁ 和内标的血浆 C. *iv* 生脉注射液(1.6 mL/kg) 1 h 后的血浆

Fig 1 LC-MS/MS The chromatograms of ginsenoside Rb₁ in plasma

A. Blank plasma B. Blank plasma with ginsenoside Rb₁ and internal standard C. Plasma sample at 1h after 1.6 mL/kg Shengmai Injection

液 10 μL, 置空白离心管中, 氮气吹干, 加入空白血浆 200 μL, 配制成血浆中人参皂苷 Rb₁ 分别为: 0.002 36、0.009 45、0.047 3、0.473、4.725、9.45 μg/L 的血浆样品, 按“血浆样品处理方法”操作, 进行分析, 建立人参皂苷 Rb₁ 的标准曲线。用加权最小二乘法(权重系数: 1/x²)进行线性回归运算, 分别求得线性回归方程为: $Y = 0.0548X + 0.0022$ ($r = 0.996$)。线性范围为 0.002 36 ~ 9.45 μg/L, 可包括人参皂苷 Rb₁ 在 Beagle 犬体内的血药浓度, 检测限为 0.002 36 μg/L ($S/N > 10$)。

2.4.3 精密度和回收率 配制人参皂苷 Rb₁ 浓度分别为 0.004 73、0.094 5 和 7.56 μg/L 的 3 种浓度

的血浆样品, 按“血浆样品处理方法”项下操作, 在不同天内连续制备并测定 3 个分析批, 每批样品 3 种浓度, 每个浓度进行 6 样本分析, 计算日内和日间的相对标准差(RSD)均小于 15%, 结果见表 1。

采用空白加样回收法, 分别于 200 μL 空白血浆中加入已知 3 种浓度的人参皂苷 Rb₁ 对照品, 按“血浆样品处理方法”项下操作, 取上清液进样分析, 获得相应药物峰面积和内标峰面积; 另取不同浓度的人参皂苷 Rb₁ 标准溶液和内标, 配置成已知 3 种浓度的标准溶液, 进样分析, 获得相应药物峰面积和内标峰面积。计算提取回收率, 结果见表 1, 3 种浓度的提取回收率为 73.31% ~ 100.12%。

表 1 方法精密度和回收率 ($n = 5 \bar{x} \pm s$)

Table 1 Recovery and precision for Rb₁ in Beagle plasma

浓度 /(× 10 ⁻³ μg/L)	日内 /(× 10 ⁻³ μg/L)	RSD/%	日间 /(× 10 ⁻³ μg/L)	RSD/%	回收率/%	RSD/%
4.73	4.98 ± 0.28	5.68	4.80 ± 0.44	9.19	92.31 ± 6.82	7.39
94.50	102.03 ± 3.09	3.03	99.83 ± 4.76	11.03	85.26 ± 0.84	0.98
7 560	6 852.01 ± 248.08	3.62	7 018.86 ± 611.48	8.71	90.05 ± 2.78	3.09

2.4.4 稳定性考察 配制人参皂苷 Rb₁ 浓度分别为 0.004 73、7.56 μg/L 的血浆样品, 分别考察血浆样品在室温下放置 8 h、血浆样本提取液在室温下放置 24 h、血浆样品放置在 -70 °C 冰箱冷冻, 反复冻融 3 次和血浆样品放置在 -70 °C 冰箱冷冻 90 d 的稳定性。按“血浆样品处理方法”项下操作, 进样分

析, 结果显示, RSD 均小于 15%, 表明人参皂苷 Rb₁ 在室温、反复冻融以及长期冷冻条件下稳定性较好。

3 药代动力学研究

3.1 血药浓度-时间曲线 7 只健康 Beagle 犬分别 *iv* 4 种生脉拆方注射液后, 人参皂苷 Rb₁ 平均血药浓度-时间曲线, 见图 2。

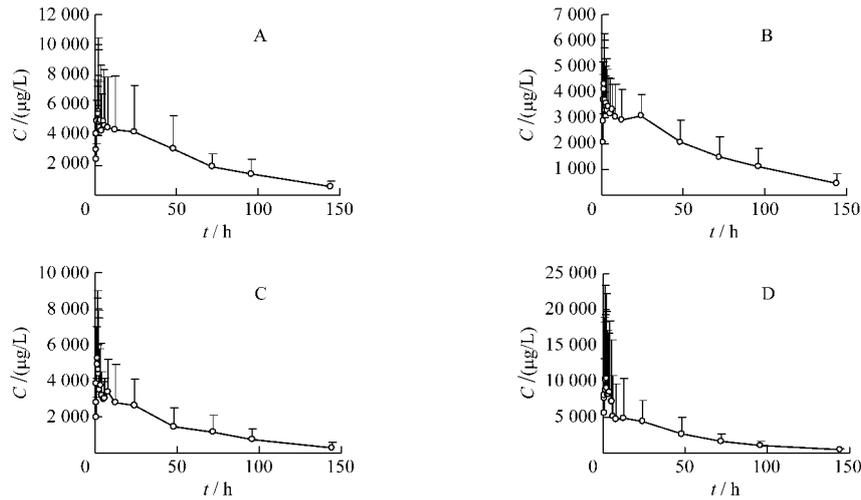


图2 生脉拆方注射液单次给药血浆中人参皂苷 Rb₁ 平均浓度-时间曲线

A. 生脉注射液 B. 参麦注射液 C. 参味注射液 D. 红参注射液

Figure 2 Mean plasma concentration-time curves of Shengmai separate components Injection after a single dose

A. Shengmai Injection B. Shenmai Injection C. Shenwei Injection D. Hongshen Injection

3.2 药代动力学参数及评价 7只健康 Beagle 犬 浓度-时间曲线经计算机拟合,结果见表2。
分别 iv 4种生脉拆方注射液后,人参皂苷 Rb₁ 血药

表2 7只健康 Beagle 犬分别 iv 4种注射液后人参皂苷 Rb₁ 药代动力学参数 (n=7 $\bar{x} \pm s$)

Table 2 The pharmacokinetics parameter after a single dose of 4 Shengmai Injection in 7 healthy Beagle

参数	单位	生脉注射液	参麦注射液	参味注射液	红参注射液
$t_{1/2}$	h	45.63 ± 11.85 **	40.48 ± 11.76*	32.31 ± 12.60	28.37 ± 8.87
t_{max}	h	1.41 ± 0.61	1.69 ± 1.16	1.90 ± 1.84	1.17 ± 0.50
C_{max}	µg/L	6.29 ± 4.65	4.92 ± 1.60	6.14 ± 3.79	12.29 ± 1.43
CL	L/h	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
V	L	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.02
AUC _{0-t}	µg/(h·L)	339.58 ± 214.95	242.29 ± 99.56	200.80 ± 123.14	330.22 ± 255.66
AUC _{0-∞}	µg/(h·L)	380.27 ± 224.61	277.84 ± 123.00	218.30 ± 142.31	342.99 ± 258.75
MRT	h	47.91 ± 6.83	45.53 ± 8.18	40.35 ± 11.50	40.50 ± 9.99

与红参组比较, * P ≤ 0.05, ** P < 0.01; Compares with hongshen: * P ≤ 0.05, ** P < 0.01。

由表2的药动学参数可见,以4种生脉拆方注射液单次给药后,用 DAS ver 2.1 软件程序对实测 t_{max} 和经对数转换后的实测 C_{max} 、AUC_{0-t} 进行统计分析;各组之间每个参数经方差分析后进行统计分析,除了 $t_{1/2}$ 有显著性差异外,其他各药动参数均无显著性差异。

4 讨论

文献[3-6]报道测定人参皂苷 Rb₁ 一般采用液相色谱-紫外检测法或荧光检测法,方法繁琐,样品处理复杂,本实验建立 LC-MS/MS 联用法同时测定血浆中 Rb₁ 浓度方法。

流动相的选择,本实验方法参考文献[7-10],采用 LC-MS/MS 法测定动物血浆中人参皂苷 Rb₁ 浓度,选择了乙腈-水系统为最佳流动相,在该条件下,人参皂苷 Rb₁ 峰、内标峰与内源性杂质峰得到良好

分离,且药物峰形好,灵敏度高能达到血浆样品测定的要求。

提取溶剂选择,文献报道^[11-12]均采用不同的有机溶剂提取,方法繁琐,本法采用乙腈沉淀方法,为人参皂苷 Rb₁ 药代动力学研究提供专属性强、精确、灵敏、重复性好检测方法,可满足人参皂苷 Rb₁ 药代动力学研究。

研究表明:4种生脉拆方注射液中人参皂苷 Rb₁ 主要药代动力学参数,通过统计分析,除了 $t_{1/2}$ 有显著性差异 (P < 0.05) 外,其他药动参数均无显著性差异 (P > 0.05),但是复方配伍与单方比较 t_{max} 、MRT 均有增加趋势,说明复方配伍有延缓药物达到高峰和入血时间的趋势,另外复方配伍与单方比较 C_{max} 却呈现出降低趋势,也说明药物配伍影响了人参皂苷 Rb₁ 在体外的含量或体内的吸收,可有

能是药物相互作用的缘故。总之,复方配伍对人参皂苷 Rb_1 的 $t_{1/2}$ 影响非常显著,说明配伍改变了人参皂苷 Rb_1 在体内的药物代谢行为,其中三味药配伍对 $t_{1/2}$ 影响最大,其次是与麦冬配伍,与五味子配伍影响较小,结果表明三味药配伍与单味药比较 $t_{1/2}$ 具有非常显著性差异 ($P < 0.01$),说明延缓了人参皂苷 Rb_1 在体内代谢速度,同时与麦冬配伍也延缓人参皂苷 Rb_1 在体内代谢速度,与单味药比较 $t_{1/2}$ 也具有统计学差异 ($P < 0.05$),说明麦冬和五味子共同作用远远大于单个的麦冬和五味子的作用,另外结果也表明在复方中麦冬作用要大于五味子作用,体现出麦冬臣药与五味子佐药的作用差别,反应了中医配伍理论的科学性,同时说明了中药复方中各药味君臣佐使地位的合理性。

参考文献:

[1] 王丽静,贾晓斌,陈彦,等. 中药复方拆方研究思路与方法[J]. 中成药, 2008, 30(9):1343-1346.
[2] 夏晶,王柯,王钢力,等. LC-MS/MS法确认生脉注射液指纹图谱的特征峰[J]. 中成药, 2007, 29(3):313-317.
[3] 夏晶,王钢力,季申,等. HPLC测定生脉注射液中4种成

分的含量[J]. 中成药, 2006, 28(1):27-31.
[4] 韩旻,傅韶,方晓玲. 三七皂苷中人参皂苷 Rg_1 与 Rb_1 口服吸收及其体内药代动力学的研究和比较[J]. 药学学报, 2007, 42(8):849-853.
[5] 林世和,余南才,易艳东,等. HPLC法测定人参芦中人参皂苷 Rb_1 、 Rg_1 、 Re 的含量[J]. 中国药师, 2010, 13(4):531-532.
[6] 夏晶,王钢力,季申,等. 生脉注射液 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中成药, 2006, 28(8):1093-1095.
[7] 杨柳,许舜军,曾星,等. 人参皂苷 Rb_1 在大鼠体内的药物代谢研究[J]. 高等学校化学学报, 2006, 27(6):1042-1044.
[8] 杨柳,刘奕明,曾星,等. HPLC/MS/MS法测定参麦注射液及人血浆中的人参皂苷 Rg_1 [J]. 药物分析杂志, 2006, 25(8):905-908.
[9] 刘奕明,杨柳,曾星,等. 液相色谱-质谱联用法测定人参皂苷 Re 在健康人血浆的浓度[J]. 中国临床药理学杂志, 2005, 21(5):381-383.
[10] 王占良,王弘,陈世忠. 高效液相色谱-二极管阵列检测/质谱法分析生脉饮煎剂中的人参皂苷类成分[J]. 色谱, 2006, 24(4):325-330.
[11] 蒋杰,李沙,龚培力,等. 单剂量口服“生脉饮”人体药代动力学的研究[J]. 华中科技大学学报, 2007, 36(2):272-274.
[12] 赵文萃,王艳萍,薛万俐,等. 血塞通注射液中人参皂苷 Rb_1 的药动学研究[J]. 药学实践杂志, 2007, 25(3):152-158.

刺五加水煎煮提取动力学模型的建立

韩林辛¹, 倪键^{1*}, 玄律², 窦津晶¹

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102; 2. 北京市海淀区北太平庄医院, 北京 100088)

关键词: 刺五加; 动力学模型; 提取

摘要: 目的: 以 Fick's 第一定律为基础, 建立中药刺五加水煎煮提取的动力学模型。方法: 讨论中药刺五加水煎煮提取过程中药材颗粒粒度 (σ_1)、溶剂倍量 (M) 和提取时间 (t) 与刺五加药材有效成分浸出量之间的关系。以高效液相色谱法测定刺五加水煎煮刺五加苷 B 和 E 含量, 将测定结果代入数学模型进行拟合。结果: 刺五加水煎煮提取有效成分的自然对数随时间、溶剂倍量的自然对数变化成良好线性关系, 最终建立溶质、浓度 (C_B) 模型 R 为刺五加充分吸收水分与干质量之比。结论: 本公式符合工业生产实际, 但温度条件仍需进一步研究。

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-1528(2011)02-0240-06

Kinetic model for extraction of *Acanthopanax Senticosus*

HAN Lin-xin¹, NI Jian^{1*}, XUAN Lu², DOU Jin-jin¹

(1. Beijing University of TCM, Beijing 100102, China; 2. Beitai pingzhuang Hospital of Haiding District, Beijing 100088, China)

收稿日期: 2010-04-12

基金项目: 十一五国家科技支撑计划课题 (2006BAI09B07)

作者简介: 韩林辛 (1984 -) 女, 硕士生, 研究方向: 中药新剂型与新技术。Tel: 13811571833

* 通讯作者: 倪键 (1964 -) 男, 教授, E-mail: njtcm@263.net