

脑心痛胶囊对缬沙坦在大鼠体内药动学的影响

姚广哲¹, 马文娟¹, 贾琪¹, 欧阳慧子², 常艳旭¹, 何俊^{1*}

1. 天津中医药大学, 天津市现代中药重点实验室, 天津 301617

2. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

摘要: 目的 研究脑心痛胶囊对缬沙坦在大鼠体内药动学的影响。方法 建立液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法检测缬沙坦血药浓度, 并进行专属性考察、回收率试验、基质效应、稳定性试验等方法学验证; 24只SD雄性大鼠, 随机均分为3组, 每组8只, 分别为缬沙坦组(A组), 缬沙坦和脑心痛胶囊单次给药组(B组), 脑心痛胶囊给药7d后, 第8天ig给予缬沙坦和脑心痛胶囊组(C组), 于给药前及给药后不同时间点由大鼠眼眶静脉丛采血, 采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定血浆中缬沙坦的质量浓度, DAS2.0软件统计分析, 得到缬沙坦的药动学参数。结果 成功建立LC-MS/MS法检测缬沙坦血药浓度方法, 方法学验证符合药动学相关规范要求。口服缬沙坦在大鼠体内的药动学属于一室模型。B组 C_{max} 明显低于A组, 但差异无统计学差异; B组 $t_{1/2}$ 显著高于A组($P<0.05$); C组 t_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 AUC_{0-1h} 、 AUC_{0-24h} 均显著高于A组($P<0.05$ 、 0.01), K_e 显著低于A组($P<0.05$); C组 AUC_{0-1h} 、 AUC_{0-24h} 显著高于B组($P<0.05$)。结论 大鼠经连续ig给药脑心痛胶囊后, 可显著延缓缬沙坦在大鼠体内的达峰时间, 并使缬沙坦在大鼠体内的生物利用度升高。

关键词: 脑心痛胶囊; HPLC-MS/MS; 缬沙坦; 血药浓度; 药动学

中图分类号: R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2020)02-0255-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.02.014

Effect of Naoxintong Capsules on pharmacokinetics of valsartan in rats

YAO Guangzhe¹, MA Wenjuan¹, JIA Qi¹, OUYANG Huizi², CHANG Yanxu¹, HE Jun¹

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the effect of Naoxintong Capsules on pharmacokinetics of valsartan in rats. **Methods** 24 SD rats were randomly divided into three groups: valsartan group (group A), valsartan group (group B) and Naoxintong Capsules group (group B), each group had 8 rats. On the 8th day, valsartan and Naoxintong Capsules were given by gavage (group C). Plasma samples were collected at different times after the drug administration from the orbital veins of the rats. The concentrations of valsartan in plasma were determined by LC-MS/MS, and the pharmacokinetic parameters of valsartan were obtained in rats by the statistical analysis of DAS 2.0 Software. **Results** Combined with the valsartan single administration group (group C), t_{max} , $t_{1/2}$, and AUC were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and K_e was significant decreased ($P<0.05$) in the Naoxintong and valsartan combined administration group. **Conclusion** The rats significantly delayed the peak time of valsartan, and the bioavailability of valsartan in rats after continuous administration of Naoxintong was increased. It is instructive to study the combined use of valsartan and Naoxintong capsule.

Key words: Naoxintong capsule; HPLC-MS/MS; valsartan; blood concentration; pharmacokinetics

脑心痛胶囊由黄芪、丹参、水蛭、地龙等16味药材组成, 具有益气活血、祛瘀通络的作用^[1]。药理研究发现, 脑心痛胶囊能够抑制血小板聚集、改善微

循环、增加纤维蛋白的活性, 已广泛应用于心血管疾病的治疗^[2-3]。脑心痛胶囊临床上常与西药联合治疗中风、脑梗死、高血压、冠心病和心绞痛等疾

收稿日期: 2019-09-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81673824)

第一作者: 姚广哲(1992—), 男, 硕士研究生, 河北沧州人, 研究方向为中药学。Tel: 15373407884 E-mail: yaoguangzhezy@163.com

*通信作者: 何俊(1981—), 男, 研究员, 吉林通化人, 研究方向为药物分析。Tel: (022)59596163 E-mail: hejun673@163.com

病^[4],并取得了较好的疗效。缬沙坦是一种选择性血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)受体拮抗剂,通过与AT₁跨膜区氨基酸作用,阻止AngⅡ与AT₁受体结合,从而阻断AngⅡ诱导的生物学效应,具有长效平稳的降压特点^[5-8]。但缬沙坦单独用药远期疗效不佳,且易出现较大的血压波动等不良反应。脑心通胶囊与缬沙坦联合应用治疗高血压,可以显著提高临床降压效果。除起协同降压效应、减轻不良反应外,还能使血液的粘稠度降低、组织的缺血缺氧情况得到改善,对心脏、大脑、肾脏起保护作用^[9]。

近年来,中西药联合应用日趋普遍。中药成分复杂,能宏观调节,疗效稳定持久;西药成分则较为单一,针对性强,药效迅速,两者联合应用可显示出各自的优越性,且能标本兼顾,具有广阔的应用前景^[10]。因此,本研究建立高效、灵敏的液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)分析方法,研究大鼠ig给药后,脑心通胶囊对缬沙坦在其体内药动学的影响,为临床联合用药提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200型高效液相色谱-Agilent 6430型三重四级杆质谱联用系统,Agilent MassHunter分析软件(美国Agilent公司);Milli-Q超纯水制备仪(天津信睿生物科技有限公司);AX 205型十万分之一天平(瑞士Mettler Toledo公司);G3KT18273型旋涡混合器(赛默飞世尔科技公司);5424R型高速控温离心机(Eppendorf公司)。

1.2 试剂

对照品:缬沙坦(批号100651-201604,质量分数99.8%)、坎地沙坦酯(内标,批号100685-200401,质量分数99.8%),购自中国食品药品检定研究院;脑心通胶囊(规格0.4 g/粒),购自陕西步长制药有限公司;乙腈、甲醇(色谱纯,赛默飞世尔科技公司);甲酸(色谱纯,ROE公司);超纯水由Milli-Q制备。

1.3 实验动物

健康SD大鼠,雄性,体质量(230±10)g,由北京维通利华公司提供,合格证号SCK(京)2014-0004。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

色谱柱:ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ Narrow Bore柱(2.1 mm×150 mm,3.5 μm);流动相:0.05%甲酸水(A)-乙腈(B),体积流量0.3 mL/min,柱温30℃,进样量5 μL。梯度洗脱:0~3.0 min,40%~90% B;3.0~6.0 min,90% B;6.0~10.0 min,90%~40% B。

2.2 质谱条件

电喷雾(ESI)离子源,扫描方式为负离子扫描,多反应监测(MRM);毛细管温度350℃;干燥气流量10 L/min;雾化压力117kPa。缬沙坦定量离子对为 m/z 434.1→179.0,裂解电压100 V,碰撞能量23 V;内标定量离子对为 m/z 609.1→309.0,裂解电压170 V,碰撞能量33 V。

2.3 对照品溶液的配制

精密称定缬沙坦对照品5 mg,甲醇溶解并定容于5 mL量瓶中,配制成1 mg/mL的缬沙坦对照品储备液。另取坎地沙坦酯对照品5 mg,甲醇溶解并稀释成10 μg/mL的工作液(内标),于4℃冰箱保存待用。

2.4 药品溶液的配制

精密称取缬沙坦标准品适量,加0.5% CMC-Na混悬溶液溶解,配制成质量浓度为0.83 mg/mL的缬沙坦溶液,于4℃冰箱保存待用。将脑心通胶囊去除外壳后,粉末研细,精密称取粉末适量,加0.5% CMC-Na混悬溶液溶解,配制成脑心通质量浓度为50 mg/mL的混悬液,于4℃冰箱保存待用。

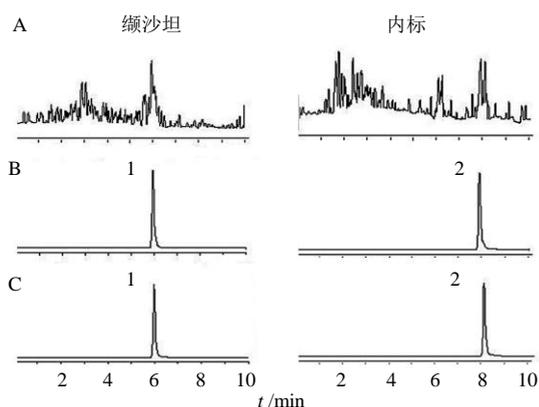
2.5 血浆样品处理方法

精密量取100 μL大鼠血浆样品,置于1.5 mL离心管中,依次加入10 μg/mL内标溶液20 μL,甲醇20 μL,涡旋混匀,再加入280 μL甲醇,涡流振荡3 min,14 000 r/min高速离心10 min,吸取上清液,进样分析。

2.6 方法学验证

2.6.1 专属性考察 ①精密量取100 μL空白大鼠血浆;②取一定量的缬沙坦对照品溶液及内标溶液置入同体积的空白大鼠血浆内;③取大鼠ig给药后的血浆样品,均按“2.5”项方法操作,并吸取上清液,进样分析,色谱图见图1。缬沙坦的保留时间为5.93 min,内标坎地沙坦酯的保留时间为7.83 min,血浆样品中内源性物质对目标性成分的测定未产生影响。

2.6.2 标准曲线及线性范围 取大鼠空白血浆,配制成含缬沙坦的质量浓度分别为20、40、200、400、2 000、4 000、8 000 ng/mL的血浆样品,按照“2.5”项方法进行的操作,吸取上清液进样,以缬沙坦与内标的峰面积的比值为纵坐标,血浆样品中缬沙坦的浓度为横坐标,线性回归计算采用加权最小二乘法,1/x作为权重系数,计算得回归方程为 $Y=2.726\ 412X+0.001\ 543$, $r=0.999\ 6$ 。结果表明,缬沙坦在20~8 000 ng/mL线性关系良好。以信噪比(S/N)≥



1-缬沙坦; 2-内标(坎地沙坦酯)

1-valsartan; 2-internal standard (candesartan cilexetil)

图1 空白血浆样品(A)、空白血浆加入缬沙坦对照品100 ng/mL(B)、大鼠ig给药后4 h后的血浆样品(C)色谱图
Fig.1 Chromatogram of blank plasma sample (A), blank plasma spiked with valsartan substance to 100 ng/mL (B), and sample collected at 4 h after ig administration (C)

10作为标准,测得缬沙坦最低定量限为0.5 ng/mL。

2.6.3 精密性与准确度 精密量取100 μL空白大鼠血浆,加入一定量的缬沙坦对照品溶液,配制成40、2 000、8 000 ng/mL 3个不同质量浓度的质控(QC)样品各6份,按“2.5”项方法操作,并同时缬沙坦标准曲线进行测定,连续测定3 d,记录缬沙坦的峰面积,计算各QC样品的测定浓度,求得该法的准确度,并计算方法的日内、日间精密性。结果见表1。

2.6.4 回收率试验 取100 μL空白大鼠血浆,配制成40、2 000、8 000 ng/mL的低、中、高3个质量浓度

的QC样品各6份,按“2.5”项方法操作,吸取上清液进样分析,记录峰面积(A_1);另取空白血浆100 μL,除不加内标外,按“2.5”项方法操作,吸取上清液并分别加入一定量的3个不同质量浓度的缬沙坦对照品(40、2 000、8 000 ng/mL)及内标溶液,涡旋混匀,注入液质联用仪中分析,记录峰面积(A_2);缬沙坦3个质量浓度的回收率分别为(81.7±1.3)%、(81.8±0.9)%、(85.1±1.8)%,RSD<5%。结果见表2,符合药理学相关规范要求。

2.6.5 基质效应 取100 μL空白大鼠血浆,除不加内标外,按“2.5”项方法操作,吸取上清液并分别加入一定量的3个不同浓度的缬沙坦对照品(40、2 000、8 000 ng/mL)及内标溶液(2 500 ng/mL),涡旋混匀,注入液相色谱仪中分析,记录峰面积(A_2);相同条件下,进样分析相应浓度的低、中、高浓度的对照品溶液,记录峰面积(A_0);缬沙坦低、中、高3个浓度的基质效应分别为(94.4±8.2)%、(96.3±7.1)%、(83.6±4.5)%。结果见表3,结果表明,内源性物质不干扰缬沙坦的测定,符合药理学相关规范要求。

2.6.6 稳定性试验 取100 μL空白大鼠血浆,配制成3个不同质量浓度(40、2 000、8 000 ng/mL)的血浆样品各6份,按“2.5”项方法操作,分别考察在室温放置4 h,反复3次-80 °C室温冻融,处理后自动进样器放置12 h以及-80 °C冷冻放置15 d的稳定性。结果见表4。结果表明样品在上述条件下稳定性良好。

表1 大鼠血浆中缬沙坦的日内日间精密性和准确度结果 (n=6)

Table 1 Intraday precision and accuracy results of valsartan in rat plasma (n=6)

浓度/ (ng·mL ⁻¹)	日内精密性			日间精密性		
	测定值/(ng·mL ⁻¹)	RE/%	RSD/%	测定值/(ng·mL ⁻¹)	RE/%	RSD/%
40	36.6±1.8	-8.5	5.0	39.6±3.5	-1.0	8.8
2 000	1 922.2±97.9	-3.9	5.1	1 989.7±146.2	-0.5	7.3
8 000	7 505.0±804.1	-6.2	10.7	7 641.2±670.1	-4.5	8.8

表2 大鼠血浆中缬沙坦提取回收率结果 (n=6)

Table 2 Extraction and recovery results of valsartan in rat plasma (n=6)

质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	平均回收率/%	RSD/%
40	81.7±1.3	1.6
2 000	81.8±0.9	1.1
8 000	85.1±1.8	2.1

表3 大鼠血浆中缬沙坦及内标的基质效应结果 (n=6)

Table 3 Matrix effect of valsartan and internal standard in rat plasma (n=6)

质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	平均回收率/%	RSD/%
40	94.4±8.2	8.7
2 000	96.3±7.1	7.4
8 000	83.6±4.5	5.4

表4 大鼠血浆中缬沙坦的稳定性结果($n=6$)Table 4 Stability results of valsartan in rat plasma($n=6$)

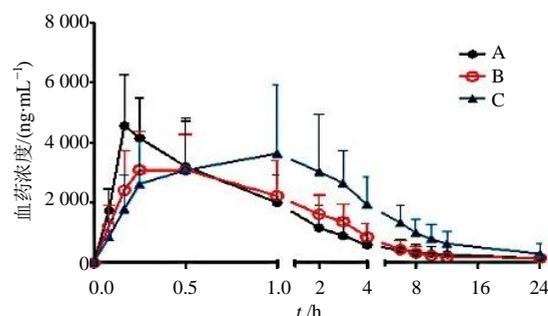
处理方法	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	测量值/(ng·mL ⁻¹)	准确度/%	RSD/%
室温放置4 h	40	39.9±1.1	99.8	2.8
	2 000	1 916.4±68.3	95.8	3.6
	8 000	7 327.3±32.7	91.6	0.5
反复冻融3次	40	37.6±1.4	94.1	3.7
	2 000	1 878.6±31.6	93.9	1.7
	8 000	7 361.9±116.6	92.0	1.6
自动进样器放置12 h	40	40.7±3.9	101.7	9.6
	2 000	1 983.1±52.0	99.2	2.6
	8 000	7 603.6±114.0	95.0	1.5
冷冻15 d	40	37.4±2.9	93.5	7.6
	2 000	1 982.1±147.3	99.1	7.4
	8 000	7 954.2±59.4	99.4	0.7

2.7 药动学研究

SD健康雄性大鼠,24只,体质量(230±10)g,随机分为3组,每组8只,分别为缬沙坦组(A组),缬沙坦和脑心通胶囊单次给药组(B组),脑心通胶囊给药7 d后,第8天ig给予缬沙坦和脑心通胶囊组(C组),给药前禁食12 h,期间自由饮水,按照8.3 mg/kg的剂量ig给药缬沙坦,500 mg/kg的剂量ig给药脑心通。分别于给药前及给药后0.08、0.17、0.25、0.50、1.00、2.00、3.00、4.00、6.00、8.00、10.00、12.00、24.00 h经大鼠眼底静脉丛采血,置于1.5 mL肝素化离心管中,7 000 r/min离心10 min,吸取上清液并冷冻保存于-80 °C冰箱中,直至进样分析。

药动学参数通过DAS 2.0软件分析获得,采用SPSS 22.0统计软件对实验数据处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较了3组之间药动学参数 t_{max} 、 C_{max} 、 AUC_{0-m} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 K_e 以及 $t_{1/2}$ 之间的差异,多组间比较用单因素方差分析(one-way-ANOVA)。

3组给药方式下的平均血药浓度-时间曲线见



A-缬沙坦; B-缬沙坦和脑心通胶囊单次给药; C-脑心通胶囊给药7 d,第8天给予缬沙坦和脑心通胶囊

A-valsartan; B-valsartan and Naoxintong capsules were given once; C-naoxintong capsules were given for 7 days, and valsartan and Naoxintong capsules were given on the 8th day

图2 3种给药方式下大鼠体内缬沙坦的平均血药浓度-时间曲线($n=6$)

Fig. 2 Plasma concentration-time curve of valsartan in rat plasma under three administration modes ($n=6$)

图2。3组大鼠ig给药缬沙坦后的药动学参数通过DAS 2.0软件分析获得,结果见表5。

表5 3种给药方式下大鼠血浆中缬沙坦的主要药动学参数($n=6$)Table 5 Pharmacokinetic parameters of valsartan in rat plasma under three administration modes ($n=6$)

参数	单位	A组	B组	C组
t_{max}	h	0.28±0.29	0.47±0.25	1.53±1.02*
C_{max}	ng·mL ⁻¹	4 813±1 439	3 316±1 229	4 051±1 941
K_e	h ⁻¹	0.56±0.23	0.30±0.11*	0.24±0.13*
$t_{1/2}$	h	1.45±0.65	2.53±0.84*	3.39±1.30**
AUC_{0-m}	h·ng·mL ⁻¹	9 789±4 601	10 622±3 430	21 989±9 921*#
$AUC_{0-\infty}$	h·ng·mL ⁻¹	12 172±6 465	11 892±3 622	28 019±14 094*#

与A组比较:* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$;与B组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs A group; # $P < 0.05$ vs B group

口服缬沙坦在大鼠体内的药动学属于一室模型。B组 C_{max} 明显低于A组,但差异无统计学差异; B组 $t_{1/2}$ 显著高于A组 ($P < 0.05$); C组 t_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 AUC_{0-m} 、 $AUC_{0-\infty}$ 均显著高于A组 ($P < 0.05$ 、 0.01), B、C组 C_{max} 、 K_e 显著低于A组 ($P < 0.05$ 、 0.01); C组 AUC_{0-m} 、 $AUC_{0-\infty}$ 显著高于B组 ($P < 0.05$)。结果表明,单次联合给药时,脑心痛胶囊可使大鼠血浆中缬沙坦的血药浓度显著降低,而长期给药时,有效地增加了药物在大鼠体内的暴露时间。

3 讨论

实验分别考察了甲酸铵和甲酸水作为流动相对实验的影响,当流动相中存在一定量的甲酸铵后内标响应值明显变好,但缬沙坦的响应值却显著降低。故采用0.05%甲酸水-乙腈为流动相,化合物峰型良好,能够满足测定条件。

缬沙坦在水中几乎不溶解,故本实验采用0.5% CMC-Na 混悬溶液溶解;实验分别考察了替米沙坦和坎地沙坦酯作为内标,对分析样品的影响。结果表明,坎地沙坦酯较替米沙坦稳定,与缬沙坦结构相似,且提取回收率较高,能够满足测定要求,故实验采用坎地沙坦酯作为内标。在血浆样品的前处理的过程中,分别考察了3种不同方法(甲醇、乙腈为沉淀蛋白试剂、醋酸乙酯为萃取液)处理血浆样品对分析物的影响。结果表明,甲醇沉淀蛋白法能够较好地将血浆中内源性杂质沉淀,且提取回收率较高。

研究表明缬沙坦在体内基本不被代谢,大鼠 ig 给药缬沙坦后,其原型药物主要经尿液、粪便、胆汁3种途径排泄^[11-12]。而P-糖蛋白(P-gp)作为一种外排转运体,可以将要进入细胞或已经进入细胞的外源性毒物(包括药物)泵出细胞外,对药物的生物利用度具有较大影响。本课题组前期研究表明,大鼠连续 ig 给药脑心痛胶囊,可对大鼠体内P-gp的活性产生抑制作用,使P-gp对药物的外排作用减弱^[13]。本研究中,脑心痛胶囊给药7 d、第8天 ig 缬沙坦,缬沙坦的 C_{max} 明显减低, t_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 AUC_{0-m} 和 $AUC_{0-\infty}$ 明显升高,表明长期给药脑心痛胶囊可显著延缓缬沙坦在大鼠体内的达峰时间,增大药物的吸收程度,相较于单独给药组,缬沙坦在大鼠体内生物利用度明显提高,可能与脑心痛胶囊抑制了大鼠体内P-gp的活性有关。

参考文献

[1] 熊百炼,李慧. 步长脑心痛胶囊临床应用研究进展 [J].

实用中医药杂志, 2014, 30(4): 374-376.

- [2] 吴国红,赵鲁剑. 步长脑心痛在原发性高血压病中的运用及对C反应蛋白、一氧化氮的影响 [J]. 海峡药学, 2011, 23(4): 91-92.
- [3] Harry G. Profiles of drug substances, excipients and related methodology [M]. Center for Pharmaceutical Physics, 10 Charles Road, Milford, NJ 08848 U. S. A. 2015.
- [4] Wang H, Zhou X K, Zheng L F, et al. Comparison of aspirin and Naointong Capsule with adjusted-dose warfarin in elderly patients with high-risk of non-valvular atrial fibrillation and genetic variants of Vitamin K epoxide reductase [J]. Chin J Integrat Med, 2018, 24(4): 247-253.
- [5] Moussa B A, Hashem Hanaa M A, Mahrouse M A, et al. A validated RP-HPLC method for the determination of rosuvastatin in presence of sacubitril/valsartan in rat plasma: Application to *in vivo* evaluation of OATP-mediated drug interaction potential between rosuvastatin and sacubitril/valsartan [J]. Microchem J, 2018, 143: 31-38.
- [6] 林秋妹. 缬沙坦胶囊联合苯磺酸氨氯地平治疗原发性高血压的疗效观察 [J]. 中国冶金工业医学杂志, 2018, 35(6): 691-692.
- [7] 邹如正. 苯磺酸氨氯地平及缬沙坦联合应用在高血压治疗中的效果研究 [J]. 中国现代药物应用, 2018, 12(23): 88-89.
- [8] Bradley T A, Shane D A, Jae K Y, et al. Valsartan [J]. Ref Mod Biomed Sci, 2017. DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.64136-3.
- [9] 孙小东. 脑心痛联合缬沙坦治疗原发性高血压的疗效观察 [J]. 吉林医学, 2013, 34(18): 3586-3587.
- [10] 李宝婷. 中西药联合使用的临床意义 [J]. 医学信息, 2013(14): 585-585.
- [11] Blobaum A L, Byers F W, Bridges T M, et al. A screen of approved drugs identifies the androgen receptor antagonist flutamide and its pharmacologically active metabolite 2-hydroxy-flutamide as heterotropic activators of cytochrome P450 3A *in vitro* and *in vivo* [J]. Drug Metab Dispos, 2015, 43(11): 1718-1726.
- [12] Choi J S, Choi J S, Choi D H. Effects of licochalcone A on the bioavailability and pharmacokinetics of nifedipine in rats: possible role of intestinal CYP3A4 and P-gp inhibition by licochalcone A [J]. Biopharm Drug Dispos, 2014, 35(7): 382-390.
- [13] 欧阳慧子,刘华明,王兴蕊,等. 非索非那定体内探针药物法考察脑心痛胶囊对大鼠P-gp活性的影响 [J]. 天津中医药, 2018, 35(1): 41-44.