

芪葵缓释片中6种活性成分在兔血浆中的药动学研究

顾和亚¹, 江静怡², 周洪亮¹, 刘志辉^{1*}

1. 南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029

2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046

摘要:目的 以芪葵颗粒为参照, 比较芪葵缓释片中6种成分在兔血浆内的药动学行为差异。方法 以地西洋作为内标建立兔血浆中黄芪甲苷、金丝桃苷、异槲皮苷、芦丁、莫诺苷、马钱苷的LC-MS/MS检测方法。考察兔ig给予芪葵缓释片及芪葵颗粒后不同时间的血药浓度变化, 并计算6种成分的药动学参数。结果 6种有效成分线性回归方程分别为黄芪甲苷 $Y=1.0 \times 10^{-4} X - 0.0099$ ($r=0.9997$); 莫诺苷 $Y=1.0 \times 10^{-4} X + 0.0387$ ($r=0.9994$); 马钱苷 $Y=3.0 \times 10^{-5} X + 0.0087$ ($r=0.9993$); 金丝桃苷 $Y=1.0 \times 10^{-3} X - 0.0161$ ($r=0.9990$); 芦丁 $Y=5.0 \times 10^{-4} X - 0.0115$ ($r=0.9994$); 异槲皮苷 $Y=1.7 \times 10^{-3} X - 0.3075$ ($r=0.9992$); 日内、日间精密度和准确度以及提取回收率均符合要求。兔ig给予芪葵缓释片及芪葵颗粒后, 芪葵颗粒中莫诺苷、马钱苷、黄芪甲苷、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷达峰浓度(C_{max})分别为(1.333±0.051)、(1.238±0.164)、(0.830±0.079)、(0.127±0.017)、(0.444±0.048)、(0.223±0.048) mg/L; $t_{1/2}$ 分别为(3.848±0.311)、(3.822±0.757)、(4.982±1.140)、(3.730±0.298)、(4.732±0.642)、(5.132±0.901) h; AUC_{0-t} 分别为(3.069±0.307)、(2.891±0.943)、(2.079±0.306)、(0.313±0.068)、(1.087±0.177)、(0.496±0.129) mg·h/L。芪葵缓释片中莫诺苷、马钱苷、黄芪甲苷、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷的 C_{max} 分别为(0.985±0.130)、(0.961±0.175)、(0.693±0.101)、(0.094±0.012)、(0.354±0.045)、(0.201±0.037) mg/L; $t_{1/2}$ 分别为(4.691±0.337)、(5.62±1.640)、(6.408±0.707)、(4.103±0.341)、(6.048±0.882)、(5.803±0.590) h; AUC_{0-t} 分别为(5.191±1.046)、(6.168±1.250)、(4.293±0.823)、(0.485±0.103)、(1.840±0.432)、(0.924±0.190) mg·h/L。芪葵缓释片与芪葵颗粒相比, 莫诺苷、马钱苷、黄芪甲苷、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷相对生物利用度分别为169.1%、213.3%、206.5%、156.0%、169.3%、186.3%。结论 芪葵缓释片能显著提高各有效成分的生物利用度。

关键词: 芪葵缓释片; 药动学; LC-MS/MS; 生物利用度; 莫诺苷; 马钱苷; 黄芪甲苷; 芦丁; 金丝桃苷; 异槲皮苷

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)12-2891-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.12.022

Pharmacokinetic study on six active ingredients of Qikui Sustained-release Tablets in rabbit plasma

GU He-ya¹, JIANG Jing-yi², ZHOU Hong-liang¹, LIU Zhi-hui¹

1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

Abstract: Objective To compare the differences in pharmacokinetic behavior of six ingredients in Qikui Sustained-release Tablets in rabbit plasma. Qikui Granules was taken as reference. **Methods** Diazepam was used as internal standard. LC-MS/MS detection methods of astragaloside, hyperin, isoquercitrin, rutin, morroniside, and loganin in rabbit plasma were established, and pharmacokinetic parameters of six components were calculated. **Results** Six active ingredients' equation of linear regressions were: astragaloside $Y=1.0 \times 10^{-4} X - 0.0099$ ($r=0.9997$), morroniside $Y=1.0 \times 10^{-4} X + 0.0387$ ($r=0.9994$), loganin $Y=3.0 \times 10^{-5} X + 0.0087$ ($r=0.9993$), hyperin $Y=1.0 \times 10^{-3} X - 0.0161$ ($r=0.9990$), rutin $Y=5.0 \times 10^{-4} X - 0.0115$ ($r=0.9994$), isoquercitrin $Y=1.7 \times 10^{-3} X - 0.3075$ ($r=0.9992$). Intra-day and inter-day precision and accuracy and recovery rate were up to the mustard. After Qikui Sustained-release Tablets and Qikui Granules being given by gavage, the maximal concentration (C_{max}) of morroniside, loganin, astragaloside, rutin, hyperin, and isoquercitrin in Qikui Granules were (1.333±0.051), (1.238±0.164), (0.83±0.079), (0.127±0.017),

收稿日期: 2019-01-25

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目(BE2012777); 江苏省药学会-奥赛康医院药学基金项目(201302)

作者简介: 顾和亚, 主任中药师, 从事中药制剂工艺及质量控制研究。E-mail: guhouzi@hotmail.com

*通信作者 刘志辉, 硕士生导师, 从事中药制剂开发及中药质量标准研究。Tel: (025)86529291 E-mail: Liuzh1008@126.com

(0.444 ± 0.048), and (0.223 ± 0.048) mg/L, $t_{1/2}$ were (3.848 ± 0.311), (3.822 ± 0.757), (4.982 ± 1.14), (3.73 ± 0.298), (4.732 ± 0.642), and (5.132 ± 0.901) h, respectively, $AUC_{(0-t)}$ were (3.069 ± 0.307), (2.891 ± 0.943), (2.079 ± 0.306), (0.313 ± 0.068), (1.087 ± 0.177), (0.496 ± 0.129) mg·h/L, respectively, C_{max} of morroniside, loganin, astragaloside, rutin, hyperin, and isoquercitrin in Qikui Sustained-release Tablets were (0.985 ± 0.13), (0.961 ± 0.175), (0.693 ± 0.101), (0.094 ± 0.012), (0.354 ± 0.045), (0.201 ± 0.037) mg/L, $t_{1/2}$ were (4.691 ± 0.337), (5.62 ± 1.64), (6.408 ± 0.707), (4.103 ± 0.341), (6.048 ± 0.882), (5.803 ± 0.59) h, $AUC_{(0-t)}$ were (5.191 ± 1.046), (6.168 ± 1.25), (4.293 ± 0.823), (0.485 ± 0.103), (1.84 ± 0.432), (0.924 ± 0.19) mg·h/L. Contrast with Qikui Granules, relative bioavailability of morroniside, loganin, astragaloside, rutin, hyperin, and isoquercitrin in Qikui Sustained-release Tablets were 169.1%, 213.3%, 206.5%, 156.0%, 169.3%, and 186.3%, respectively. **Conclusion** Qikui Sustained-release Tablets can significantly improve the bioavailability of each active ingredient in rabbit.

Key words: Qikui Sustained-release Tablets; pharmacokinetics; LC-MS/MS; bioavailability; morroniside; loganin; astragaloside; rutin; hyperin; isoquercitrin

芪葵颗粒为江苏省中医院医疗机构制剂,由黄芪、黄蜀葵花、酒萸肉 3 味中药组成,具有健脾胃、补肝肾的功能,临床上用于治疗糖尿病肾病,疗效显著^[1-2]。该方由于是按传统工艺制备的医疗机构制剂,因此存在服用量大,服用次数多等缺点。为解决上述问题并提高其疗效,筛选并确定了黄芪总皂苷、酒萸肉环烯醚萜总苷和总黄酮是本方治疗糖尿病肾病的有效部位,并将其制成口服制剂。但研究发现该总有效部位群成分存在吸收代谢速度快、有效血药浓度维持时间短等问题,需要多次服用,因此将其制成芪葵颗粒有效部位缓释片(芪葵缓释片),以达到延长药物在体内作用时间、减少服用量和服药次数的目的。本实验建立了 LC-MS/MS 测定兔血浆中 6 种有效成分的方法,比较芪葵颗粒与芪葵缓释片药动学差异,为芪葵缓释片的研究开发提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Thermo Fisher TSQ Quantum AccessMAX 三重四级杆质谱仪(电喷雾离子源、Xcalibur 1.4 工作站、LCQuan 数据处理软件); Dionexu PLC 超高效液相色谱系统(包括二元输液泵、自动进样器); Milli-Q GradientA 10 超纯水器(Millipore Inc. 公司); WH-2 微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器厂); PCB-11 振荡仪(Eppendorf 公司); Eppendorf Centrifuge 5430R 冷冻高速离心机(Eppendorf Co. 公司); Sartorius BP 211D 分析天平(Sartorius 公司); Centrivap Concentrator/Cold Trap 高速冷冻离心浓缩仪(美国 Labconco 公司)。

1.2 药品与试剂

对照品黄芪甲苷(批号 120809)、金丝桃苷(批号 111207)、芦丁(批号 130918)、异槲皮苷(批号 110404)均由成都普菲德生物技术有限公司提供,

质量分数均 $\geq 98\%$;对照品马钱苷(批号 121120)、莫诺苷(批号 130301)均由南京宁歧医药科技有限公司提供,质量分数 $\geq 98\%$;对照品地西洋(批号 171225-200903)由中国食品药品检定研究院提供,质量分数 $\geq 99\%$;芪葵缓释片(江苏省中医院制剂实验室自制,批号 20141123,每片 0.55 g,每克相当于饮片 14.12 g);芪葵颗粒(江苏省中医院制剂部制备,批号 20140402,每袋 10 g,每克相当于饮片 2.33 g);醋酸乙酯、正丁醇(南京宁试化学试剂有限公司);甲醇(Tedia 公司);甲酸(ROE Scientific 公司);超纯水。

1.3 动物

新西兰大耳白兔,雌雄各半,体质量 2~3 kg,购自南京市浦口区莱芙养殖场,动物许可证号 SCSK(苏) 2014-0004。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷、金丝桃苷、异槲皮苷、芦丁、莫诺苷、马钱苷对照品适量,分别配制成质量浓度为 2.106、0.391、1.196、2.004、1.982、1.005 mg/mL 的溶液,作为对照品溶液。

2.1.2 内标溶液的制备 精密称取 12.38 mg 地西洋对照品至 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解定容至刻度,从中吸取一定体积,配成 0.396 μ g/mL 的内标溶液。

2.2 色谱与质谱条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m),分流比为 6:4;体积流量 1 mL/min,柱温 30 $^{\circ}$ C,进样量 10 μ L,流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液,流动相 B 为乙腈,梯度洗脱:0~5 min, 10%~15% B; 5~11 min, 15%~18% B; 11~18 min, 18%~22% B; 18~22 min, 22%~70% B; 22~23 min, 70% B; 23~23.5 min, 70%~10%

B; 23.5~26 min, 10% B。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子化源 (ESI), 喷雾电压 3 500 V, 毛细管温度 350 °C, 鞘气压力 30 V, 辅助气压 10 V, 载气为氮气。正、负离子模式检测, 用于定量分析的检测离子为莫诺昔 m/z 450.1→405.2 $[M+HCOO]^-$, 碰撞能量 12 eV; 马钱昔 m/z 434.5→227.1 $[M+HCOO]^-$, 碰撞能量 19 eV; 芦丁 m/z 609.0→299.9 $[M-H]^-$, 碰撞能量 39 eV; 金丝桃昔、异槲皮昔 m/z 462.4→299.9 $[M-H]^-$, 碰撞能量 29 eV; 黄芪甲昔 m/z 806.7→627.3 $[M+Na]^+$, 碰撞能量 31 eV; 地西洋 m/z 285.0→154.0 $[M+H]^+$, 碰撞能量 27 eV。

2.3 给药与样品采集

10 只白兔 (雌雄各半), 随机分为 2 组, 分别为芪葵缓释片组和芪葵颗粒组, 实验前 12 h 禁食不禁水, 分别 ig 给予芪葵缓释片 3 片 (塞入会厌部, 灌适量清水送下)、芪葵颗粒 (颗粒以水溶解) 10 g (给药量折算成生药量均为 23.3 g)。芪葵缓释片组分别于给药前和给药后 0、30 min 及 1、2、4、6、8、10、12、24、36、48 h 耳缘静脉取血 1 mL, 放置于 1.5 mL 离心管中并且加入肝素抗凝, 静置, 以 6 000 r/min 离心 10 min, 移取上层血浆于另一 1.5 mL 离心管中, 待用。芪葵颗粒组分别于给药前和给药后 0、15、30、45 min 及 1、2、4、6、8、10、12、24 h 耳缘静脉取血 1 mL, 放置于 1.5 mL 离心管中并且加入肝素抗凝, 静置, 以 6 000 r/min 离心 10 min, 移取上层血浆于另一 1.5 mL 离心管中, 待用。

2.4 血浆样品处理方法

室温融化血浆, 精密吸取 100 μ L, 置于 1.5 mL Eppendorf 管中, 再依次加入 10 μ L 内标地西洋, 1 mL 醋酸乙酯萃取, 涡旋振荡 3 min, 15 000 r/min 高速离心 10 min, 吸取上清液至 2 mL Eppendorf 管中, 剩余沉淀中再加入 1 mL 正丁醇继续萃取, 涡旋振荡 5 min (2 000 r/min), 15 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 合并醋酸乙酯层与正丁醇层, 置于离心浓缩仪, 40 °C 挥干溶剂, 残渣用 100 μ L 甲醇复溶, 涡旋振荡 1 min, 15 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 备用。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 按照“2.4”项血浆样品处理方法对空白血浆、空白血浆加对照品、样品血浆进行处理, LC-MS/MS 进样, 进行色谱分析。

2.5.2 线性关系及定量限 分别取黄芪甲昔、金丝

桃昔、异槲皮昔、芦丁、莫诺昔、马钱昔 6 个对照品储备液适量, 甲醇稀释至各对照品质量浓度约为 100 μ g/mL 的混合对照品溶液, 并依次稀释。取空白血浆 100 μ L, 分别加入 10 μ L 混合对照品溶液和内标溶液, 配制成质量浓度约为 100、250、500、1 000、2 500、5 000 ng/mL 的系列对照品溶液, 并按照“2.4”项血浆样品处理方法处理样品, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样, 进行色谱分析。

2.5.3 精密度和准确度考察 按照“2.4”项下血浆处理样品方法操作, 选择高、中、低 3 个质量浓度的质量控制样品 (QC) 各 5 份, 于同 1 d 内测定 3 次, 计算日内精密度, 连续测定 3 d, 计算日间精密度, 并且计算准确度。

2.5.4 提取回收率试验 选择高、中、低 3 个质量浓度的 QC 样品各 5 份, 按照“2.4”项下血浆处理样品方法操作, 按照色谱条件进样, 分析各色谱峰。取空白血浆 100 μ L, 同法按照“2.4”项下血浆处理样品方法操作, 经过处理后加入上述相应的混合对照品溶液, 然后同法操作, 以 QC 样品和对照样品峰面积的比值计算提取回收率。

2.5.5 基质效应 取空白血浆 100 μ L, 按照“2.4”项下血浆处理样品方法操作, 经过处理后加入高、中、低 3 个质量浓度的混合对照品溶液, 然后同法操作, 按照色谱条件进样, 分析各色谱峰, 并与相同质量浓度的混合对照品溶液未经处理直接进样所得的峰面积相比, 计算基质效应。

2.5.6 稳定性试验 选择高、中、低 3 个质量浓度的 QC 样品各 5 份, 按照“2.4”项下血浆处理样品方法操作, 按以下储藏条件进行稳定性考察: ①血浆样品室温放置 8 h 的稳定性; ②-20 °C 条件下反复冻融 3 次 (每次间隔 24 h) 的稳定性; ③血浆样品在-20 °C 条件下的长期稳定性 (7 d)。

2.6 数据处理

峰面积由 ThermoXcalibur 数据处理软件处理, 采用 DAS 2.0 计算兔给药后血浆的药动力学参数。

3 结果

3.1 专属性

在实验条件下, 测得的色谱图见图 1, 待测成分的保留时间分别为莫诺昔 7.76 min、马钱昔 10.33 min、芦丁 19.12 min、金丝桃昔 20.63 min、异槲皮昔 21.30 min、黄芪甲昔 23.52 min、地西洋 (内标) 23.80 min, 各成分峰与血浆内源性杂质峰分离良好, 且内源性杂质对内标与药物检测无干扰。

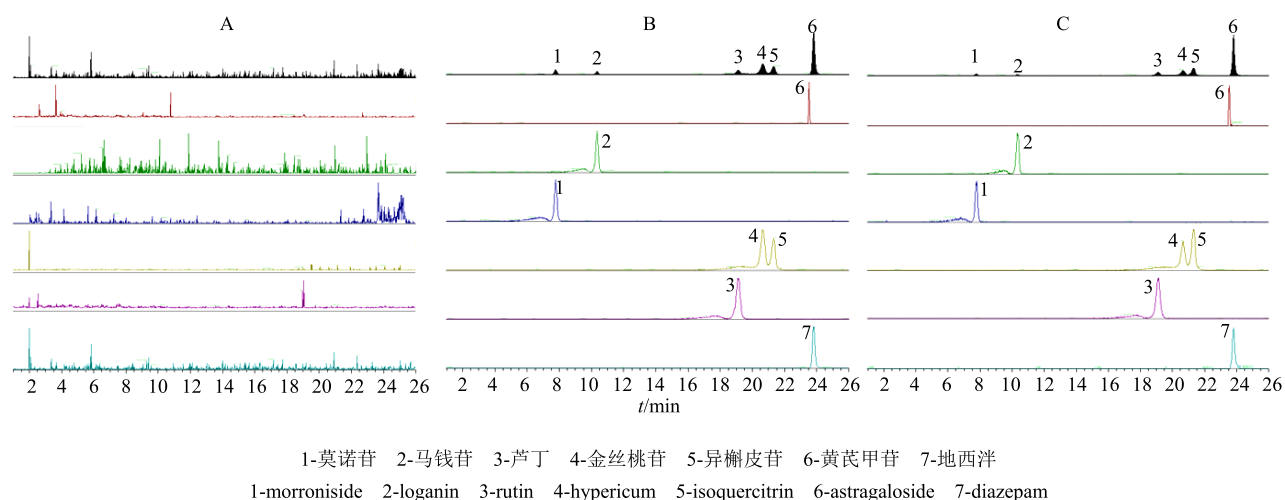


图 1 空白血浆 (A)、空白血浆+对照品 (B) 和给药后的血浆样品 (C) 的总离子流色谱图及提取离子色谱图

Fig. 1 TIC and EIC of blank plasma (A), blank plasma + RES (B), and plasma sample (C)

3.2 线性关系

以待测成分和内标峰面积的比值为纵坐标 (Y), 待测成分的质量浓度为横坐标 (X), 进行线性回归分析, 得到各个单体成分的标准曲线和相关系数: 黄芪甲苷 $Y=1 \times 10^{-4} X - 0.009\ 9$, $r=0.999\ 7$, 线性范围 $105.3 \sim 5\ 265.0$ ng/mL; 莫诺昔 $Y=1 \times 10^{-4} X + 0.038\ 7$, $r=0.999\ 4$, 线性范围 $99.1 \sim 4\ 955.0$ ng/mL; 马钱苷 $Y=3 \times 10^{-5} X + 0.008\ 7$, $r=0.999\ 3$, 线性范围 $100.5 \sim 5\ 025.0$ ng/mL; 金丝桃苷 $Y=1 \times 10^{-3} X - 0.016\ 1$, $r=0.999\ 0$, 线性范围 $97.8 \sim 4\ 890.0$ ng/mL; 芦丁 $Y=5 \times 10^{-4} X - 0.011\ 5$, $r=0.999\ 4$, 线性范围 $100.2 \sim 5\ 010.0$ ng/mL; 异槲皮苷 $Y=1.7 \times 10^{-3} X - 0.307\ 5$, $r=0.999\ 2$, 线性范围 $119.6 \sim 5\ 980.0$ ng/mL。

3.3 精密度和准确度

根据当日标准曲线计算 QC 样品的质量浓度, 考察日内、日间精密度和准确度。结果 6 种成分高、中、低质量浓度的精密度和准确度: 黄芪甲苷日内精密度分别为 2.84%、7.27%、6.01%, 准确度分别为 93.24%、90.76%、90.99%; 日间精密度分别为 2.59%、5.01%、4.35%, 准确度分别为 92.35%、88.66%、89.51%; 莫诺昔日内精密度分别为 4.14%、4.39%、7.43%, 准确度分别为 98.75%、93.86%、100.29%; 日间精密度分别为 5.38%、3.41%、5.35%, 准确度分别为 94.59%、93.27%、90.93%; 马钱苷日内精密度分别为 3.95%、8.55%、4.21%, 准确度分别为 93.40%、97.06%、90.57%; 日间精密度分别为

4.23%、8.35%、4.25%, 准确度分别为 95.40%、89.55%、88.47%; 金丝桃苷日内精密度分别为 4.78%、6.96%、6.64%, 准确度分别为 95.46%、90.50%、91.70%; 日间精密度分别为 3.80%、2.69%、6.64%, 准确度分别为 92.66%、91.18%、90.79%; 芦丁日内精密度分别为 3.31%、5.10%、4.06%, 准确度分别为 91.85%、99.41%、85.11%; 日间精密度分别为 2.44%、5.00%、5.74%, 准确度分别为 94.80%、90.15%、91.02%; 异槲皮苷日内精密度分别为 3.43%、5.09%、6.67%, 准确度分别为 94.33%、86.62%、89.36%; 日间精密度分别为 2.37%、3.00%、3.30%; 准确度分别为 94.13%、88.63%、90.86%。表明本实验条件下各个成分日内、日间精密度和准确度均符合要求。

3.4 提取回收率

按照“2.5.4”项下测定得出黄芪甲苷高、中、低 3 个质量浓度样品中峰面积比值分别为 $(95.9 \pm 4.9)\%$ 、 $(103.6 \pm 3.8)\%$ 、 $(92.8 \pm 4.4)\%$, RSD 分别为 5.1%、3.7%、4.8% ($n=5$), 莫诺昔高、中、低 3 个质量浓度样品中峰面积比值分别为 $(97.1 \pm 4.0)\%$ 、 $(95.0 \pm 5.6)\%$ 、 $(96.2 \pm 4.7)\%$, RSD 分别为 4.1%、3.7%、4.8% ($n=5$), 马钱苷高、中、低 3 个质量浓度样品中峰面积比值分别为 $(97.4 \pm 5.8)\%$ 、 $(94.6 \pm 3.5)\%$ 、 $(94.6 \pm 9.0)\%$, RSD 分别为 6.0%、3.7%、9.5% ($n=5$), 金丝桃苷高、中、低 3 个质量浓度样品中峰面积比值分别为 $(96.8 \pm 5.2)\%$ 、 $(100.7 \pm 7.1)\%$ 、 $(96.4 \pm 5.5)\%$, RSD 分

别为 5.4%、7.1%、5.7% ($n=5$)，芦丁高、中、低 3 个质量浓度样品中峰面积比值分别为 (94.9 ± 4.6) %、(95.4 ± 5.3) %、(96.6 ± 4.8) %，RSD 分别为 4.8%、5.5%、5.0% ($n=5$)，异槲皮苷高、中、低 3 个质量浓度样品中峰面积比值分别为 (98.4 ± 3.3) %、(99.3 ± 5.2) %、(97.7 ± 7.4) %，RSD 分别为 3.3%、5.3%、7.5% ($n=5$)，结果显示，该实验条件下各个成分的回收率良好。

3.5 基质效应

按照“2.5.5”项下测定得出黄芪甲苷高、中、低 3 个质量浓度样品峰面积比值分别为 (97.8 ± 3.6) %、(100.1 ± 3.7) %、(97.9 ± 5.0) %，RSD 分别为 3.7%、3.7%、5.1% ($n=5$)，莫诺苷高、中、低 3 个质量浓度样品峰面积比值分别为 (99.7 ± 3.6) %、(98.2 ± 2.6) %、(98.8 ± 1.2) %，RSD 分别为 3.6%、2.6%、1.2% ($n=5$)，马钱苷高、中、低 3 个质量浓度样品峰面积比值分别为 (100.4 ± 7.4) %、(101.0 ± 8.7) %、(99.2 ± 3.3) %，RSD 分别为 3.6%、8.6%、3.4% ($n=5$)，金丝桃苷高、中、低 3 个质量浓度样品峰面积比值分别为 (98.4 ± 3.5) %、(99.0 ± 7.0) %、(96.0 ± 2.7) %，RSD 分别为 3.6%、7.1%、2.9% ($n=5$)，芦丁高、中、低 3 个质量浓度样品峰面积比值分别为 (97.7 ± 4.1) %、(90.0 ± 3.9) %、($98.3 \pm$

2.8) %，RSD 分别为 4.2%、3.9%、2.9% ($n=5$)，异槲皮苷高、中、低 3 个质量浓度样品峰面积比值分别为 (100.1 ± 3.0) %、(100.7 ± 5.9) %、(95.3 ± 6.5) %，RSD 分别为 3.0%、5.8%、6.8% ($n=5$)。结果显示，血浆基质的存在对样品测定无明显影响。

3.6 稳定性

根据“2.5.6”项下操作，将测得质量浓度的平均值与理论值进行对照，结果发现在 3 种条件下制得的 QC 样品，经过分析后，RSD 均在 $\pm 13.79\%$ 之内，表明各个成分在上述的条件下均比较稳定。

3.7 药动学实验结果

3.7.1 各指标性成分在兔体内的药-时曲线 芪葵缓释片和芪葵颗粒 ig 给药后兔血浆中 6 种成分的药-时曲线见图 2 和 3。

3.7.2 各指标性成分在兔体内的药动学参数 本实验采用 DAS 2.1 软件对数据进行分析得到药动学统计参数，结果见表 1 和 2。结果可知，相对于芪葵缓释片，芪葵颗粒给药后各成分的达峰时间 ($t_{\max}$) 短，说明口服吸收较快；且各成分的体内滞留时间 (MRT) 也短；在芪葵颗粒组各个成分的 $t_{1/2}$ 均小于芪葵缓释片组，说明颗粒组消除速度相比缓释片组要快；各成分达峰血药浓度 ($C_{\max}$)，缓释片组与颗粒组相比减少。综合比较，与颗粒相比，芪葵缓释

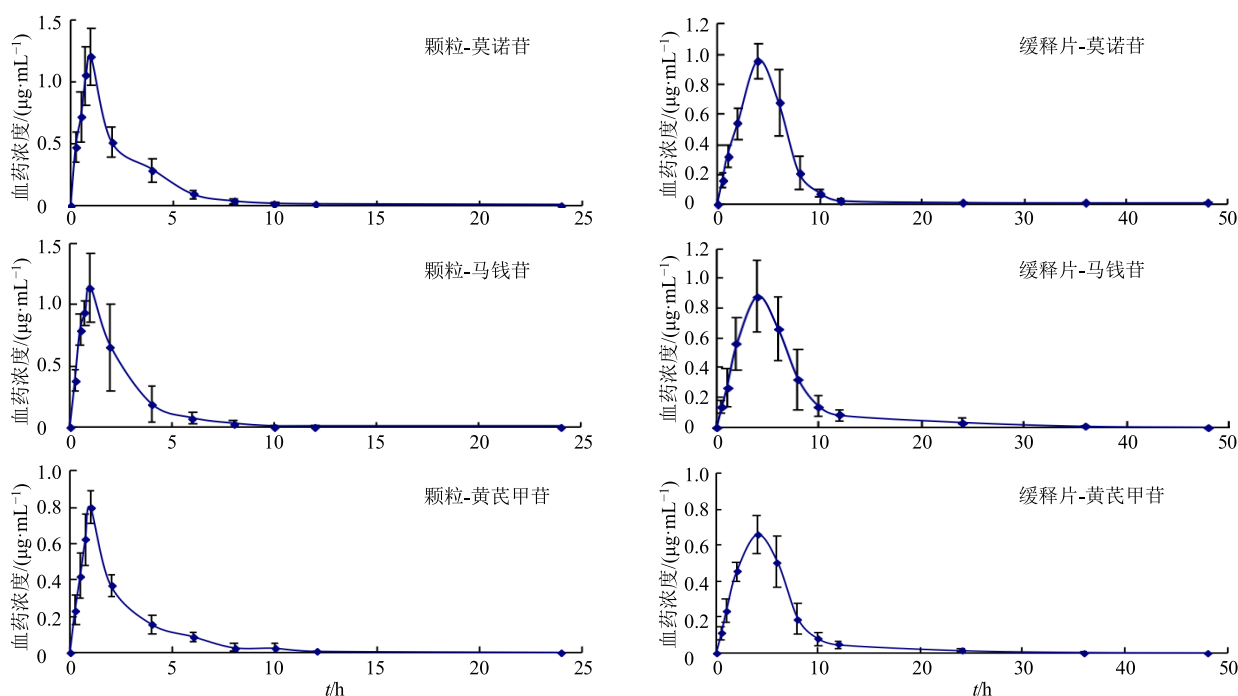
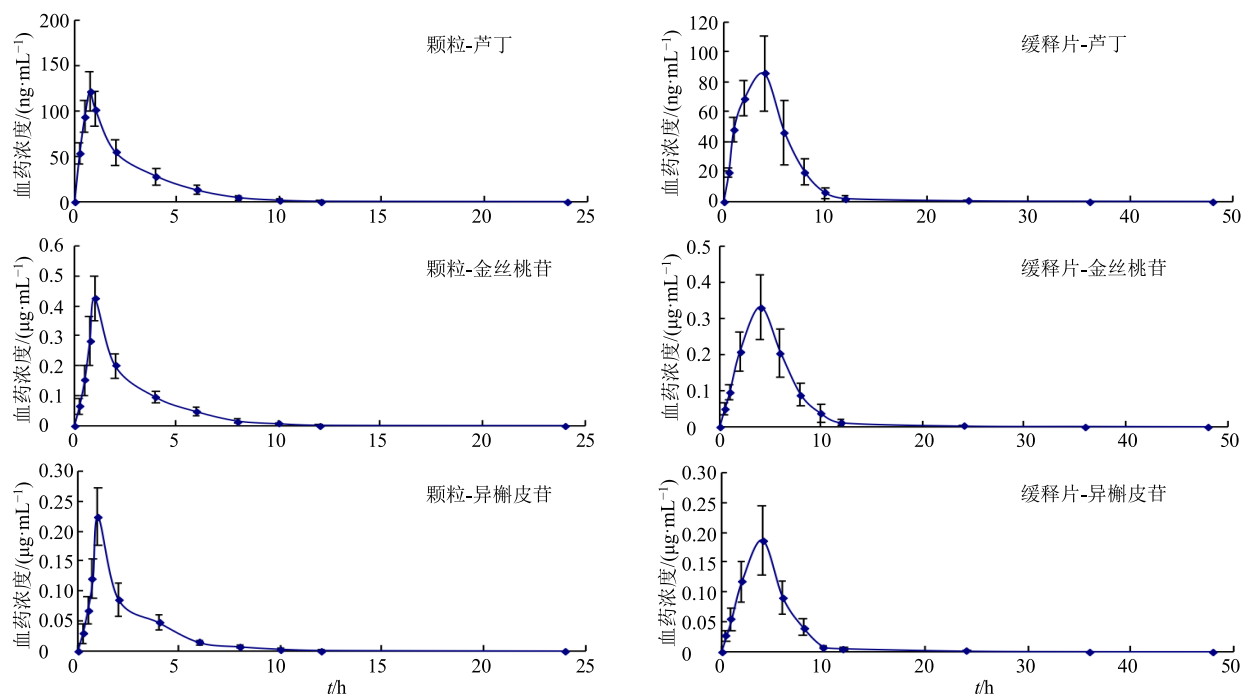


图 2 芪葵缓释片和芪葵颗粒 ig 给药后兔血浆中莫诺苷、马钱苷和黄芪甲苷的药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves of morroniside, loganin, and astragaloside IV in rabbits administrated with Qikui Sustained-release Tablets or Qikui Granules ($\bar{x} \pm s, n=5$)

图 3 芪葵缓释片和芪葵颗粒 ig 给药后兔血浆中芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷的药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Fig. 3 Mean plasma concentration-time curves of rutin, hyperin, and isoquercitrin in rabbits administrated with Qikui Sustained-release Tablets or Qikui Granules ($\bar{x} \pm s, n = 5$)表 1 芪葵颗粒组各指标性成分在兔体内的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 1 Pharmacokinetic parameters of Qikui Granules in rabbits ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

参数	单位	莫诺苷	马钱苷	黄芪甲苷	芦丁	金丝桃苷	异槲皮苷
$AUC_{0 \sim t}$	$mg \cdot h \cdot L^{-1}$	3.069 ± 0.307	2.891 ± 0.943	2.079 ± 0.306	0.313 ± 0.068	1.087 ± 0.177	0.496 ± 0.129
$MRT_{0 \sim t}$	h	2.498 ± 0.297	2.369 ± 0.302	2.854 ± 0.385	2.661 ± 0.362	2.837 ± 0.366	2.561 ± 0.132
$t_{1/2}$	h	3.848 ± 0.311	3.822 ± 0.757	4.982 ± 1.141	3.730 ± 0.298	4.732 ± 0.642	5.132 ± 0.901
t_{max}	h	0.917 ± 0.284	1.083 ± 0.465	0.958 ± 0.958	0.792 ± 0.102	0.958 ± 0.225	1.000 ± 0.165
C_{max}	$mg \cdot L^{-1}$	1.333 ± 0.051	1.238 ± 0.164	0.830 ± 0.079	0.127 ± 0.017	0.444 ± 0.048	0.223 ± 0.048

表 2 芪葵缓释片组各指标性成分在兔体内的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 2 Pharmacokinetic parameters of Qikui Sustained-release Tablets in rabbits ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

参数	单位	莫诺苷	马钱苷	黄芪甲苷	芦丁	金丝桃苷	异槲皮苷
$AUC_{0 \sim t}$	$mg \cdot h \cdot L^{-1}$	5.191 ± 1.046	6.168 ± 1.250	4.293 ± 0.823	0.485 ± 0.103	1.840 ± 0.432	0.924 ± 0.190
$MRT_{0 \sim t}$	h	5.027 ± 0.282	6.979 ± 1.796	6.064 ± 0.875	4.595 ± 0.701	5.209 ± 0.675	4.894 ± 0.289
$t_{1/2}$	h	4.691 ± 0.337	5.620 ± 1.640	6.408 ± 0.707	4.103 ± 0.341	6.048 ± 0.882	5.803 ± 0.590
t_{max}	h	4.333 ± 0.816	4.333 ± 1.506	4.333 ± 0.816	3.333 ± 1.033	3.677 ± 0.816	3.667 ± 0.816
C_{max}	$mg \cdot L^{-1}$	0.985 ± 0.130	0.961 ± 0.175	0.693 ± 0.101	0.094 ± 0.012	0.354 ± 0.045	0.201 ± 0.037

片给药后各主要活性成分的 C_{max} 减少, t_{max} 延长, MRT 延长, 显示出明显的缓释效果。

3.8 相对生物利用度计算

生物利用度是指药物经血管外途径给药吸收后, 进入全身血液循环的相对量。它是衡量不同制

剂剂型效果的一个重要指标。相对生物利用度是生物利用度的一种, 指的是同一药物不同制剂在相同条件下的百分利用率。本实验以芪葵缓释片给药后各成分的 $AUC_{0 \sim t}$ 和芪葵颗粒给药后各成分的 $AUC_{0 \sim t}$ 的比值为相对生物利用度, 结果莫诺苷、马

钱昔、黄芪甲昔、芦丁、金丝桃昔、异槲皮昔的相对生物利用度分别为 169.1%、213.3%、206.5%、156.0%、169.3%、186.3%。结果可知,缓释片相对颗粒,6 种成分的相对生物利用度均大于 100%,说明缓释片的吸收效果优于颗粒。

4 讨论

前期实验筛选并确定了芪葵颗粒黄芪总皂昔、酒萸肉环烯醚萜总昔和总黄酮是本方治疗糖尿病肾病的有效部位,筛选结果与文献报道一致^[1-5]。因此选择黄芪中的黄芪甲昔,酒萸肉中的马钱昔、莫诺昔,黄蜀葵花中的金丝桃昔、异槲皮昔、芦丁作为芪葵缓释片药动学研究的指标性成分;同时参考相关文献报道^[6-8]建立了兔 ig 给予芪葵缓释片及芪葵颗粒后血浆中黄芪甲昔、金丝桃昔、异槲皮昔、芦丁、莫诺昔、马钱昔的 LC-MS/MS 检测方法,进而获得其药动学参数,为缓释片的研究开发提供了依据。

本实验对血浆样品前处理方法进行了考察^[9-11],以 6 种成分的提取回收率为考察指标,比较甲醇沉淀蛋白法,乙腈沉淀蛋白法,醋酸乙酯萃取、正丁醇萃取、醋酸乙酯+正丁醇萃取方法,因为缓释片成分较多,各个提取方法中成分提取回收率有差别,而醋酸乙酯+正丁醇萃取法提取效果相对较好,所以综合考虑,选取醋酸乙酯+正丁醇萃取法处理血浆样品。

在血浆样品测定中采用了 Thermo Fisher Quantum Access MAX 三重四级杆质谱仪进行检测,该仪器可同时进行正、负离子扫描,能够满足对不同特征目标化合物的定量分析,地西洋在本实验室前期多个生物样本分析中,表现出良好的色谱行为和质谱响应,因此在本实验中优先选用其作为内标并采用响应更好的正离子模式。由于所检测的 6 个目标物中的 5 个采用了负离子模式采集信号,因此在后期进行类似化合物同步定量检测时将考虑筛选出负离子模式下响应较好的化合物做为内标。

所检测的成分中金丝桃昔和异槲皮昔是同分异构体,较难分离,通过对流动相、色谱柱进行摸索^[12-14],得出适宜的流动相是 0.01%甲酸水-乙腈,梯度洗脱。方法学考察结果表明,该方法简便可行,结果可靠。

根据人与兔剂量的换算,在预试验中缓释片的用量为 1 片,然而血药浓度非常低,因此为了能够系统比较各个成分体内过程差异,最终确定给予 3 片量,颗粒与缓释片药量相当,在该条件下能够较

好地研究相关物质的体内过程。

从缓释片和颗粒的药动学参数^[15-16]可知,相对缓释片,芪葵颗粒给药后各成分 $t_{\max}$ 缩短,说明口服吸收较快;MRT 缩短;在颗粒组各个成分的 $t_{1/2}$ 均小于缓释片组,说明颗粒中各活性成分的消除速度相比缓释片要快; $C_{\max}$ 缓释片与颗粒相比减少。所以芪葵缓释片与颗粒相比 $C_{\max}$ 减少, $t_{\max}$ 延长, MRT 延长,显示明显的缓释效果。

芪葵缓释片相对芪葵颗粒所得相对生物利用度研究发现:6 种成分的相对生物利用度均大于 100%,说明采用缓释片给药可以显著提高各指标性成分的吸收和利用,可能的原因是缓释片释放药物速度缓慢,发挥药物疗效,药物需要先从凝胶层中释放,再被吸收而发挥药效,该结果说明缓释片可以有效地实现药物的缓慢释放。

参考文献

- [1] 黄莉吉,余江毅,朱博钰,等. “芪葵颗粒”联合西医常规疗法治疗早期糖尿病肾病 31 例临床研究 [J]. 江苏中医药, 2017, 49(4): 29-31.
- [2] 严倩华. 芪葵颗粒治疗早期糖尿病肾病疗效观察及其对肾小管上皮细胞 EMT 影响的机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [3] 姜静岩,尹晓飞,王书杰,等. 黄芪甲昔对糖尿病模型大鼠造影剂肾损伤的保护作用 [J]. 解放军药学报, 2017, 33(3): 218-221.
- [4] 陈廷芳,郭永平,桂定坤,等. 黄芪甲昔干预高糖诱导的足细胞转分化的体外研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2017, 18(6): 482-485.
- [5] 许惠琴,朱 荃. 山茱萸环烯醚萜总昔对实验性糖尿病肾病病变的保护作用 [J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版, 2003, 19(6): 342-345.
- [6] 段 煜,裴 科,蔡 皓,等. 以黄芪-山茱萸治疗糖尿病肾病为例探究药对研究的新策略 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(21): 3919-3926.
- [7] 陈 萍,万毅刚,王朝俊,等. 黄蜀葵花制剂治疗慢性肾脏病的机制和疗效 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(15): 2252-2256.
- [8] Chang X, Guo G, Fan Z, et al. Simultaneous determination of two bioactive components of Huangqi Guizhi Wuwu Decoction in rat plasma using UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study [J]. J Chin Pharm Sci, 2018, 27(4): 263-272.
- [9] 韩根利,刘宏胜,王树森,等. RP-HPLC 法同时测定山茱萸类制剂中莫诺昔、马钱昔、山茱萸新昔、齐墩果酸及熊果酸 [J]. 中草药, 2017, 48(24): 5168-5173.
- [10] 池玉梅,朱华云,居 羚,等. 高效液相-四极杆飞行时

- 间串联质谱分析黄蜀葵花中黄酮醇类化合物 [J]. 分析化学, 2009, 37(2): 227-231.
- [11] 李小娜, 王 巧, 张兰桐, 等. 山茱萸中马钱苷在大鼠体内的药物动力学研究 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(1): 4-7.
- [12] 蔡源源, 孙 华, 王 玮, 等. 醋柳黄酮缓释片的药动学初步研究 [J]. 河南大学学报, 2008, 27(4): 36-39.
- [13] 曹小帅, 沙 美, 欧阳强, 等. 黄蜀葵花中 4 种黄酮类成分体内整合药动学研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 255-259.
- [14] 陆林玲, 钱大玮, 郭建明, 等. 一测多评法测定黄蜀葵花中 7 个黄酮类成分 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(12): 2082-2087.
- [15] 杨秀岭, 袁志芳, 张兰桐, 等. 照山白总黄酮中杨梅苷、金丝桃苷和槲皮苷在大鼠体内的药动学 [J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(19): 1610-1614.
- [16] Ma Y M, Xie H, Zhu S M, *et al.* Pharmacokinetics of astragaloside IV in rabbits and its excretion in rats [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*, 2004, 23(9): 563-566.
- [17] 杨素芹, 刘文惠, 张继敏, 等. 液相色谱-串联质谱法测定大鼠血浆中黄芪甲苷及其药动学 [J]. 中国新药与临床杂志, 2011, 30(9): 705-709.
- [18] Yan L X, Guo D A. Quantitation of astragaloside IV in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2005, 824(1): 244-248.