

四逆汤分散片的制备及药动学研究

林雪¹, 李斌¹, 张月林¹, 陈欣欣¹, 张悦², 郑红月³, 汪红¹, 蒋莱¹, 郑杭生¹, 赵小迎^{2*}, 李范珠^{1*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402
2. 温州市中西医结合医院, 浙江 温州 325000
3. 浙江中医药大学图书馆, 浙江 杭州 310053

摘要: **目的** 制备四逆汤分散片 (Sini Decoction dispersible tablets, SDDT), 并阐明其药动学行为。 **方法** 采用粉末直接压片法进行 SDDT 的制备。以崩解时限为评价指标, 采用正交设计优化制剂处方。运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”对 10 批 SDDT 与 10 批四逆汤汤剂 (Sini Decoction Decoction, SDD) 进行相似度评价。以 UPLC-MS/MS 法测定大鼠血浆中 9 种四逆汤指标成分 (苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、次乌头碱、新乌头碱、乌头碱、6-姜酚、甘草苷、甘草酸铵), 以 SDD 为参比, 考察 SDDT 的药动学特征。 **结果** SDDT 最优处方中四逆汤浸膏粉、交联聚乙烯吡咯烷酮 (PVPP)、低取代羟丙基纤维素 (L-HPC)、甘露醇与硬脂酸镁的质量比为 50.0 : 5.0 : 5.0 : 38.5 : 1.5。建立了 10 批 SDD 和 10 批 SDDT 的 UPLC 指纹图谱, 各样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均在 0.9 以上, 表明 2 种剂型组间与组内指标成分的差异均较小。成功建立了可同时测定血浆中 9 种指标成分的 UPLC-MS/MS 分析方法, 该方法准确、专属性好、灵敏度高。药动学结果表明, 与 SDD 相比, SDDT 主要指标成分苯甲酰次乌头原碱和 6-姜酚的达峰时间 (T_{max}) 提前 ($P < 0.05$), 苯甲酰次乌头原碱、6-姜酚、甘草苷的药-时曲线下面积 ($AUC_{0 \sim t}$ 和 $AUC_{0 \sim \infty}$) 显著提高 ($P < 0.05$, 0.001), 苯甲酰次乌头原碱和苯甲酰新乌头原碱的峰浓度 (C_{max}) 显著提高 ($P < 0.01$)。 **结论** 成功制备了 SDDT, 且处方工艺稳定, 成品中指标成分的波动较小; 相较于汤剂, 分散片提高了方中指标成分的体内吸收速度与程度。

关键词: 四逆汤; 分散片; 汤剂; 多指标成分; 指纹图谱; 药动学; UPLC-MS/MS; 苯甲酰次乌头原碱; 苯甲酰新乌头原碱; 苯甲酰乌头原碱; 次乌头碱; 新乌头碱; 乌头碱; 6-姜酚; 甘草苷; 甘草酸铵

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)24-8403-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.24.009

Preparation and *in vivo* pharmacokinetics of Sini Decoction dispersible tablets

LIN Xue¹, LI Bin¹, ZHANG Yuelin¹, CHEN Xinxin¹, ZHANG Yue², ZHENG Hongyue³, WANG Hong¹, JIANG Lai¹, ZHENG Hangsheng¹, ZHAO Xiaoying², LI Fanzhu¹

1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China
2. Wenzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Wenzhou 325000, China
3. Libraries of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To prepare Sini Decoction dispersible tablets (四逆汤分散片, SDDT) and elucidate their pharmacokinetic properties. **Methods** SDDT were prepared using a powder direct compression method. An orthogonal design experiment was conducted to optimize the formulation, focusing on disintegration time as the evaluation criterion. The similarity between 10 batches of SDDT and 10 batches of SDD was assessed using the “Similarity Evaluation Software of Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine”. The pharmacokinetic characteristics of SDDT were investigated by determining the nine indicators in rat plasma using UPLC-MS/MS, including benzoylhypaconine, benzoylmesaconine, benzoylaconine, hypaconitine, mesaconitine, aconitine, 6-gingerol, liquiritin, ammonium glycyrrhizinate, with SDD as the reference. **Results** The optimal formulation for the

收稿日期: 2024-08-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074027); 浙江省自然科学基金资助项目 (LZ21H280001); 浙江中医药大学附属医院科研专项 (2022FSYYZZ31); 温州市基础性科研项目 (Y20240033)

作者简介: 林雪 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药物新剂型与新技术。Tel: 18076089668 E-mail: 1945396624@qq.com

*通信作者: 李范珠, 教授, 博士生导师, 主要从事药物新剂型与新技术研究。Tel: (0571)61768130 E-mail: lifanzhu@zcmu.edu.cn

赵小迎, 主任医师, 研究生导师, 从事妇产科临床研究。E-mail: drzhaoxy666@163.com

SDDT was found to have a mass ratio of Sini Decoction extract, PVPP, L-HPC, mannitol, and magnesium stearate of 50.0:5.0:5.0:38.5:1.5. The UPLC fingerprints of 10 batches of SDD and 10 batches of SDDT were established. The similarity of the fingerprints of each sample to the reference fingerprint was above 0.9, indicating that there were minimal differences in the target components between two dosage forms and within dosage form groups. A highly accurate, specific, and sensitive UPLC-MS/MS method was successfully developed for simultaneous determination of nine active ingredients in plasma. Pharmacokinetic analysis revealed that, compared to SDD, the time to peak blood concentration ($T_{\max}$) for benzoylhypaconine and 6-gingerol of SDDT was significantly reduced ($P < 0.05$). Additionally, the AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$ for benzoylhypaconine, 6-gingerol and liquiritin was significantly increased ($P < 0.05, 0.001$), and the $C_{\max}$ for benzoylhypaconine and benzoylmesaconine was also significantly higher in the dispersible tablets ($P < 0.01$). **Conclusion** SDDT were successfully prepared with a stable process and minimal fluctuation in indicator components. Compared to the decoction, the dispersible tablets exhibited improved *in vivo* absorption rates and extent for the active components.

Key words: Sini Decoction; dispersible tablets; decoction; multi-component; fingerprint; pharmacokinetics; UPLC-MS/MS; benzoylhypaconine; benzoylmesaconine; benzoylaconine; hypaconitine; mesaconitine; aconitine; 6-gingerol; liquiritin; ammonium glycyrrhizinate

四逆汤，是汉代张仲景所创的经典方剂之一。《伤寒杂病论》记载四逆汤处方用量为“甘草（炙）二两，干姜一两半，附子（生用，去皮，破八片）一枚”。根据对古代度量衡的考证^[1]，各药味用量折算为现代剂量分别为炙甘草 31.25 g、生附子 15 g、干姜 23.49 g。临床上多取其温阳散寒、回阳救逆之功效，应用于心血管疾病的治疗。然而，传统剂型四逆汤汤剂（Sini Decoction Decoction, SDD）存在质量不稳定，贮存与携带不便以及服用口感差，患者顺应性差等缺点，制约了其广泛应用^[2-3]。此外，四逆汤的组成成分复杂，含有多种生物碱类、皂苷类、黄酮类成分，多种指标成分的极性相对较弱^[4-5]，若制成普通固体制剂后存在溶出度低的问题。

分散片作为一种固体制剂，相较于液体口服制剂，具有剂量准确、稳定性好、携带、运输和贮存方便等优点，故患者用药依从性较好。同时，分散片在遇水后能够快速崩解并均匀分散，促进难溶性成分的溶出，并迅速还原为汤剂的状态，从而能改善部分中药成分溶出慢的不足，有利于药物更快地吸收，提高生物利用度，并适合老人、儿童和吞服困难的患者。因此，将四逆汤制成分散片，能有效克服四逆汤传统汤剂的缺点并满足其速效要求，是其临床应用中理想的剂型选择。

药动学是研究药物成分在体内吸收、分布、代谢与排泄的动力学的科学。制剂剂型的差异会影响药物在机体内的吸收等过程，导致药动学参数的变化，从而影响疗效^[6]。通过比较不同制剂的药动学变化，是判断剂型改革是否成功的重要依据。因此，对四逆汤传统汤剂与分散片进行药动学比较研究，能够揭示分散片中的成分从给药部位进入血液循环

的速度和程度，有助于评价分散片的疗效和安全性是否与汤剂相当。然而，中药复方为多成分复杂体系，各有效成分的体内过程和对机体的影响各不相同，且各成分之间会相互影响，其产生的整体效应是各有效成分在体内作用的综合结果。中药多成分药动学研究主要揭示中药多种有效成分的体内过程，对阐释中药整合调节作用机制及指导临床合理用药等都具有重要作用^[7]。因此，监测四逆汤多成分的体内过程，比较不同剂型对其药动学参数的影响，可为四逆汤新制剂的开发提供科学依据，为其临床使用提供参考。

本课题针对临床治疗中对四逆汤新制剂的需求，拟将其传统汤剂改良制成分散片，并在完成新制剂关键质量评价的基础上，考察制剂中 9 种指标成分（苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、次乌头碱、新乌头碱、乌头碱、6-姜酚、甘草苷、甘草酸铵）的药动学行为。本研究结果将为四逆汤分散片（Sini Decoction dispersible tablets, SDDT）的开发与应用奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

TDP-6 型单冲压片机，上海信源制药机械有限公司；CP225D 型电子分析天平，德国 Sartorius 公司；ZPJ-4 型智能片剂四用仪，天津市精拓仪器科技有限公司；UPLC H-Class 型超高效液相色谱仪，美国 Waters 公司；Avanti JXN-26 型落地式大容量离心机，美国 Eckman Coulter 有限公司；FreeZone 型冷冻干燥机，美国 Labconco 公司；LNG-CM-101 型膜分离设备，上海朗极膜分离设备工程有限公司；KDM 型调温电热套，山东鄄城华鲁电热仪器有限

公司; B-260 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; QTRAP 5500 型三重四级杆质谱仪, 美国 AB Sciex 公司; VXMNFS 型涡旋振荡器, 美国 OHAUS 公司; Sorvall Legen Micro 17R 型冷冻离心机, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Mill-Q 型超纯水系统, 美国 Millipore 公司。

1.2 试药

生附子、炙甘草与干姜采购自亳州市万珍中药饮片厂, 经浙江中医药大学药学院李范珠教授鉴定, 分别为毛茛科乌头属植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根的加工品、豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和姜科姜属植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎。制备指纹图谱研究的 20 批样品由 3 批药材制备而成, 其中 1~3 批和 11~13 批样品由第 1 批药材制备而成, 3 味药材的批号分别为生附子 221026、炙甘草 221006、干姜 221006; 4~6 批和 14~16 批由第 2 批药材制备而成, 3 味药材的批号分别为生附子 230125、炙甘草 230128、干姜 230112; 7~10 批和 17~20 批由第 3 批药材制备而成, 3 味药材的批号分别为生附子 230425、炙甘草 230406、干姜 230406; 20 批样品依次编号为 S1~S20。

淀粉 (批号 20110802)、微晶纤维素 (批号 20110802) 采购自上海泛科史康医药科技有限公司; 甘露醇 (批号 M24GS149532)、乳糖 (批号 J25M9R62184)、交联羧甲基纤维素钠 (批号 T16J11Z118578)、低取代羟丙基纤维素 (low-substituted hydroxypropyl cellulose, L-HPC, 批号 Z25A6W2709)、微粉硅胶 (批号 J20HS174749)、交联聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone, PVPP, 批号 J30HS189873)、硬脂酸镁 (批号 221001) 采购自安徽山河药用辅料有限公司。

对照品苯甲酰乌头原碱 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 MUST-22042014)、苯甲酰次乌头原碱 (质量分数 $\geq 99\%$, 批号 MUST-22030911)、苯甲酰新乌头原碱 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 MUST-22102410)、乌头碱 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 MUST-21052504)、次乌头碱 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 MUST-22032312)、新乌头碱 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 MUST-21110310)、甘草苷 (质量分数 $\geq 99\%$, 批号 MUST-21052114)、6-姜酚 (质量分数 $\geq 99\%$, 批号 MUST-22011411) 采购自成都曼思特生物科技有限公司; 磷酸 (批号 C15948691)、甘草酸单铵盐对照品 (质量分数 $\geq$

98% , 批号 C13498725) 采购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 对照品氢化可的松 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 SC9540) 采购自北京索莱宝科技有限公司; 对照品葛根素 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 P92932HIS1) 采购自天津希恩思生化科技有限公司; 醋酸铵 (批号 20210527) 采购自天津市光复科技发展有限公司; 甲醇 (批号 23055140)、乙腈 (批号 23085040) 采购自安徽天地高纯溶剂有限公司; 甲酸 (批号 C2130066) 采购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

1.3 动物

健康的雄性 SD 大鼠, 体质量 (200 ± 20) g, SPF 级, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 合格证号: 20220004030856, 许可证号: SCXK (沪) 2022-0004。所有大鼠均在温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $(50 \pm 15)\%$ 和明暗循环周期为 12 h 的环境下饲养, 自由饮水和进食。购鼠后常规适应饲养 1 周。动物实验经浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会批准, 批准号 IACUC-20190916-04。

2 方法与结果

2.1 SDDT 的处方优化

2.1.1 四逆汤浸膏粉的制备 称取炙甘草 31.25 g、生附子 15 g、干姜 23.49 g, 加入 16 倍量纯水浸泡 1 h 后, 回流提取 1.5 h, 提取 2 次, 合并 2 次提取液。提取液减压浓缩至相对密度为 1.05~1.10 (25°C)。于浓缩液中加入无水乙醇, 使乙醇体积分数达到 70%, 充分搅拌均匀后静置 16 h, 取上清液进行陶瓷膜滤过, 滤液减压浓缩至相对密度为 1.05~1.10 (25°C), 再经冷冻干燥 (真空度 15.0 Pa, 温度 -41°C), 即得四逆汤浸膏粉。

2.1.2 SDDT 处方优化正交试验设计与结果 根据预实验结果, 甘露醇作为稀释剂时, 崩解时间较短, 可压性好, 硬度符合要求; 崩解剂联合使用比单一崩解剂的崩解效果好, PVPP 与 L-HPC 联合作为崩解剂的效果最好, 并且通过调整联合崩解剂的比例, 可以优化分散片的崩解时间; 硬脂酸镁作为润滑剂时, 一定程度上改善了分散片的流动性和可压性。因此, 选择 PVPP 与 L-HPC 质量比 (A)、PVPP 和 L-HPC 总用量 (B)、硬脂酸镁用量 (C) 为优化因素, 采用 $L_9(3^4)$ 表进行正交设计试验, 以崩解时限为评价指标, 筛选 SDDT 的最佳处方。试验设计与结果见表 1。各个因素对分散片崩解时限的影响程度为 $B > A > C$, 结合表 2 方差分析结果, A、B 因

表 1 正交试验优化 SDDT 处方设计与结果
Table 1 Optimization of SDDT prescription design and results by orthogonal experiment

试验号	A	B	C	D (误差)	崩解时限/s
1	1 : 1 (1)	10 (1)	0.5 (1)	(1)	129.89
2	1 : 1 (1)	20 (2)	1.0 (2)	(2)	125.65
3	1 : 1 (1)	30 (3)	1.5 (3)	(3)	119.25
4	2 : 1 (2)	10 (1)	1.0 (2)	(3)	124.85
5	2 : 1 (2)	20 (2)	1.5 (3)	(1)	117.54
6	2 : 1 (2)	30 (3)	0.5 (1)	(2)	111.39
7	3 : 1 (3)	10 (1)	1.5 (3)	(2)	125.62
8	3 : 1 (3)	20 (2)	0.5 (1)	(3)	115.75
9	3 : 1 (3)	30 (3)	1.0 (2)	(1)	110.39
K ₁	374.79	380.36	357.03	357.82	
K ₂	353.78	358.94	360.89	362.66	
K ₃	351.76	341.03	362.41	359.85	
R	23.03	39.33	5.38	4.84	

表 2 方差分析结果
Table 2 Analysis results of variance

误差因素	偏差平方和	自由度	F值	显著性
A	108.431 3	2	27.534 1	$P<0.05$
B	258.492 6	2	65.639 5	$P<0.05$
C	5.128 3	2	1.302 2	
D (误差)	3.938 1	2		

$F_{0.05}(2, 2)=19.00$ $F_{0.01}(2, 2)=99.00$ 。

素对分散片的崩解时限有显著性影响 ($P<0.05$)，根据表 1 确定分散片的优化处方组成为 A₁B₁C₃，即浸膏粉、PVPP、L-HPC、甘露醇与硬脂酸镁的质量比例为 50.0 : 5.0 : 5.0 : 38.5 : 1.5。

2.1.3 SDDT 优化处方的验证试验 按正交试验优化的最佳处方，进行 3 次验证试验，以分散均匀性、崩解时限与硬度作为指标对 3 批分散片进行评价，结果见表 3。SDDT 的崩解时限均在 3 min 内，硬度在 40 N 左右，分散均匀性符合要求。崩解时限和硬

表 3 优化工艺验证结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 3 Verification results of optimized process ($\bar{x} \pm s, n=3$)

编号	分散均匀性	崩解时限/s	硬度/N
1	符合要求	121.58±1.50	41.90±0.46
2	符合要求	120.34±1.76	40.00±0.53
3	符合要求	123.29±2.50	41.00±0.91

度的 RSD 均小于 3%，表明该处方的稳定、可控。

2.1.4 溶出度测定^[8]

(1) 色谱条件：色谱柱为 Ultimate UPLC XB-C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 柱；检测波长 235 nm；体积流量 0.2 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 2 μL；流动相为乙腈-20 mmol/L 醋酸铵水溶液（含 0.1%磷酸），梯度洗脱：0~11 min, 20%~25%乙腈；11~15 min, 25%~28%乙腈；15~20 min, 28%~39%乙腈；20~29 min, 39%~50%乙腈。

(2) 溶出度测定：参照《中国药典》2020 年版四部，采用桨法测定溶出度。以 0.1 mol/L 盐酸溶液为溶出介质，转速为 75 r/min，温度为 (37±1) ℃，分别在 5、10、15、20、30、45、60 min 时取样 5 mL，同时补充同温等体积的溶出介质。样品溶液用 0.45 μm 滤膜滤过，按“2.1.4 (1)”项下的色谱条件测定甘草苷、苯甲酰新乌头碱、甘草酸和 6-姜酚的含量，同法测定“2.1.3”项下的 3 批分散片的含量，计算各时间点累积溶出率，结果见表 4。可见，不同批次的 SDDT 中 4 种成分在 15 min 内的溶出度均在 80%以上，不同批次间的溶出度无明显差异。

2.2 SDD 与 SDDT 的制备

2.2.1 SDD 按“1.2”项下药材批次组合，分别称取炙甘草 31.25 g、生附子 15 g、干姜 23.49 g，加水 600 mL，大火煎煮至沸腾后改文火煎煮 1.5 h，趁热滤过。将滤液浓缩至 240 mL，趁热滤过，得四逆汤

表 4 不同批次 SDDT 的溶出度测定结果
Table 4 Dissolution determination results of different batches of SDDT

t/min	甘草苷累积溶出率/%			苯甲酰新乌头碱累积溶出率/%			甘草酸累积溶出率/%			6-姜酚累积溶出率/%		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
5	30.40	28.96	31.92	29.65	29.24	31.45	25.60	24.84	27.65	28.67	30.37	28.12
10	79.85	77.65	81.84	70.03	71.56	73.14	71.68	70.54	73.44	70.32	75.23	72.92
15	86.00	85.63	87.65	83.43	82.58	84.09	82.54	80.06	84.14	81.65	82.54	80.56
20	89.92	88.53	89.65	87.23	86.35	87.92	86.30	83.71	87.98	85.37	86.30	84.23
30	91.45	89.34	90.34	87.56	86.48	88.07	86.48	84.88	87.67	85.14	87.78	85.43
45	92.30	92.67	93.45	90.25	91.18	90.77	88.77	87.23	88.54	88.76	89.08	87.89
60	94.76	93.46	94.55	92.34	92.59	92.73	92.46	90.68	91.56	90.24	91.55	90.57

汤剂 (S1~S10) [9]。

2.2.2 SDDT 按“1.2”项下药材批次组合,分别称取炙甘草 31.25 g、生附子 15 g、干姜 23.49 g,按照“2.1.1”项下方法制备四逆汤浸膏粉,按照“2.1.2”项下方法及处方优化结果,制备 SDDT(S11~S20)。

2.3 指纹图谱研究

2.3.1 色谱条件 同“2.1.4 (1)”项。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取苯甲酰新乌头原碱、甘草苷、甘草酸和 6-姜酚对照品适量,加入甲醇制成分别含 0.45、0.43、0.61、0.53 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备

(1) SDD: 精密移取 SDD 1 mL,置于 2 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,即得 SDD 供试品溶液。

(2) SDDT: 取 SDDT 10 片,研细,取细粉约 0.55 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 5 mL 甲醇,称定质量,超声提取(功率 250 W、频率 40 kHz) 10 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,即得 SDDT 供试品溶液。

2.3.4 精密度试验 分别取同一批 (S1、S11) 供试品溶液,按照“2.3.1”项下色谱条件连续进样 6 次,以峰 12 (甘草酸) 作为参照峰,计算得各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1%,相对峰面积的 RSD 均小于 2%,表明该仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 分别取同一批 (S1、S11) 供试品溶液,分别于制备后 0、2、4、6、10、12 h 进行检测,以峰 12 (甘草酸) 作为参照峰,计算得各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1%,相对峰面积的 RSD 均小于 3%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.3.6 重复性试验 分别取 S1、S11 样品,按照“2.3.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,然后按照“2.3.1”项下色谱条件进样检测,以峰 12 (甘草酸) 作为参照峰,计算得各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1%,相对峰面积的 RSD 均小于 3%,表明该方法重复性良好。

2.3.7 指纹图谱的建立与相似度评价 分别精密吸取 10 批 SDD (S1~S10) 和 10 批 SDDT (S11~S20) 供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图,将得到的 20 批样品 (S1~S20) 的色谱图导入到“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”。选取 S1 为参照图谱,时间窗宽度

设为 0.1 min,自动匹配色谱峰,生成 10 批 SDD 样品 (S1~S10) 和 10 批 SDDT 样品 (S11~S20) 指纹图谱叠加图及共有模式对照指纹图谱 (R, 图 1)。共标定 14 个共有峰,通过加入对照品,观察对应峰面积的变化,指认出 4 个色谱峰,分别为 2 号峰甘草苷,5 号峰苯甲酰新乌头原碱,12 号峰甘草酸,14 号峰 6-姜酚。混合对照品溶液的 UPLC 图见图 2。以 R 为参照,计算 10 批 SDD 样品 (S1~S10) 和 10 批 SDDT 样品 (S11~S20) 的指纹图谱相似度分别为 1.000、0.998、0.999、0.998、0.982、0.981、0.982、0.985、0.985、0.982 和 0.918、0.919、0.918、0.918、0.918、0.918、0.919、0.918、0.919、0.918,相似度均在 0.9 以上,结果表明 SDD 和 SDDT 的指纹图谱具有高度的相似性,成品中化学成分的波动较小。

2.4 药动学研究

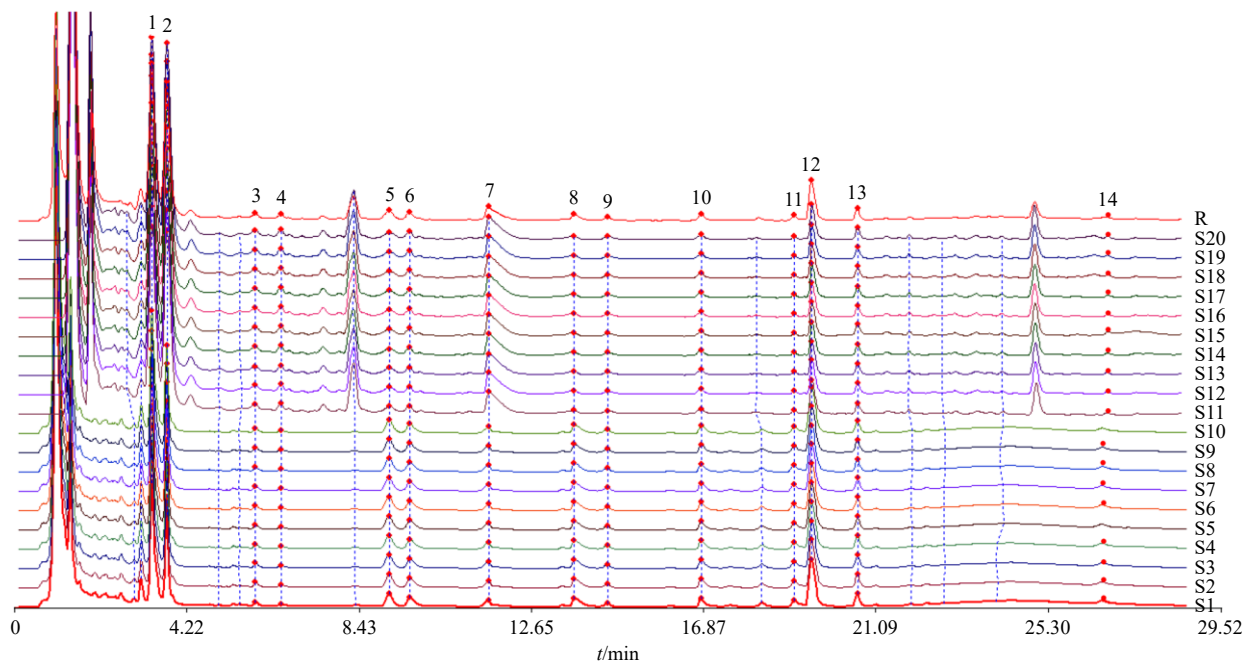
以 SDD 样品 (S1) 和 SDDT 样品 (S11) 进行药动学研究。

2.4.1 大鼠给药与样品采集 大鼠在给药前禁食 12 h,但不禁水。将大鼠分为 2 组 (每组 6 只),分别标记为 SDD 组和 SDDT 组。按照生药量 5.57 g/kg 的剂量^[10]对各组大鼠进行 ig 给药,并分别于给药后 10、20、30、45 min 及 1、1.5、2、4、6、8、12、24 h,经眼眶眼底静脉丛取血 0.4 mL,置于肝素 EP 管中,随后立即在 4 °C 环境中,以 1 500×g 离心 15 min,取上层血浆,置于-80 °C 保存。

2.4.2 溶液的制备

(1) 混合对照品储备液: 分别精密称取苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、次乌头碱、新乌头碱、乌头碱、甘草苷、6-姜酚、甘草酸铵对照品适量,加甲醇稀释至刻度,得各对照品储备液。精密量取各对照品储备液适量,加甲醇配制成含苯甲酰次乌头原碱 1 600 ng/mL、苯甲酰新乌头原碱 880 ng/mL、苯甲酰乌头原碱 750 ng/mL、次乌头碱 55.5 ng/mL、新乌头碱 8.55 ng/mL、乌头碱 6 ng/mL、甘草苷 31 250 ng/mL、6-姜酚 502 500 ng/mL、甘草酸铵 5 920 ng/mL 的混合对照品储备液,后续逐级稀释,制备质量控制 (quality control, QC) 样品溶液,所有溶液均放置于 4 °C 保存。

(2) 内标储备液: 精密称取氢化可的松、葛根素对照品适量,配制成含正离子内标氢化可的松 (1.2 μg/mL) 和负离子内标葛根素 (1.5 μg/mL) 的内标储备液,置于 4 °C 保存。



2-甘草苷; 5-苯甲酰新乌头原碱; 12-甘草酸; 14-6-姜酚; 图 2 同。
2-liquiritin; 5-benzoylmesaconine; 12-glycyrrhizic acid; 14-6-gingerol; same as figure 2.

图 1 10 批四逆汤 (S1~S10) 和 10 批 SDDT (S11~S20) 的 UPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 UPLC fingerprints of 10 batches of Sini Decoction (S1—S10) and 10 batches of SDDT (S11—S20) and their control fingerprint (R)

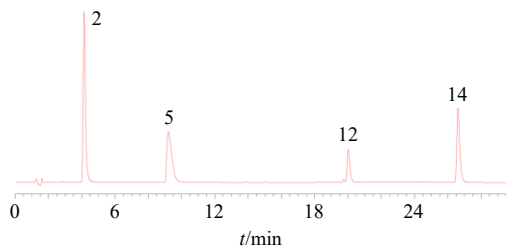


图 2 混合对照品溶液的 UPLC 图

Fig. 2 UPLC of mixed reference substances solution

(3) 标准样品和质控样品: 取“2.4.2 (1)”项下混合对照品储备液, 用甲醇稀释配制不同质量浓度的质控标准溶液, 于 4 ℃ 保存。使用时, 分别精密吸取各质量浓度的质控标准溶液 100 μL 至干净的 EP 管中, 氮气流下吹干, 残渣加入空白大鼠血浆 150 μL, 涡旋振荡 3 min 溶解后作为定量下限样品 (LLOQ) 和低、中、高质量浓度质控样品 (LQC、MQC、HQC)。具体质量浓度见表 5。

表 5 质控样品的质量浓度

Table 5 Concentration of quality control samples

样品	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)								
	苯甲酰次乌头原碱	苯甲酰新乌头原碱	苯甲酰乌头原碱	次乌头碱	新乌头碱	乌头碱	6-姜酚	甘草苷	甘草酸铵
LLOQ	0.08	0.09	1.50	0.05	0.12	0.04	4.36	1.95	4.63
LQC	65.00	80.00	30.00	0.75	0.17	0.15	3 000.00	165.00	7.40
MQC	300.00	130.00	60.00	6.00	0.54	0.35	60 000.00	250.00	14.80
HQC	500.00	310.00	190.00	9.00	1.30	1.45	80 000.00	300.00	592.00

2.4.3 血浆样品的前处理 取 150 μL 大鼠空白血浆或者含药血浆, 分别加入 100 μL 氢化可的松和葛根素内标储备液, 再加入 3 倍量体积的甲醇以沉淀蛋白质。涡旋 3 min 后, 在 4 ℃ 下以 10 000×g 的条件离心 10 min; 取上清液至干净的 EP 管中, 氮气流下吹干。使用时, 将残渣用 150 μL 70% 甲醇复

溶, 混合均匀, 以 13 800×g 离心 10 min, 过 0.22 μm 滤膜, 取上清液进样分析。

2.4.4 大鼠血浆中 9 种指标成分 UPLC-MS/MS 分析条件

(1) 色谱条件: 色谱柱为 Ultimate UPLC XB-C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 柱; 流动相由 0.1% 甲

酸水溶液-乙腈组成, 梯度洗脱条件: 0~10 min, 5~95%乙腈; 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 40 ℃; 进样量 1 μL。

(2) 质谱条件: 离子源为电喷雾电离 (ESI); 扫描方式为多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM), 同时监测正、负离子模式。仪器参数: 离子喷雾电压 (ionspray voltage, IV) +5 500 V/-4 500 V; 气帘气 (curtain gas) 241.32 kPa (35 psi); 雾化气 (ion source gas 1) 275.79 kPa (40 psi); 辅助气 (ion source gas 2) 275.79 kPa (40 psi); 雾化温度 450 ℃; 检测的离子对与主要质谱参数信息见表 6。

表 6 9 种成分的离子对和主要质谱参数

Table 6 Ion pairs and main mass spectrum parameters of nine components

化合物	离子模式	离子对	去簇电 压/V	碰撞能 量/V
苯甲酰次乌头原碱	[M+H] ⁺	574.2/542.0	80	50
苯甲酰新乌头原碱	[M+H] ⁺	590.2/540.1	80	50
苯甲酰乌头原碱	[M+H] ⁺	604.2/554.3	80	50
次乌头碱	[M+H] ⁺	616.2/556.2	80	45
新乌头碱	[M+H] ⁺	632.3/572.1	80	50
乌头碱	[M+H] ⁺	646.1/586.4	80	50
6-姜酚	[M-H] ⁻	293.1/193.2	80	30
甘草苷	[M-H] ⁻	417.2/255.2	130	30
甘草酸铵	[M-H] ⁻	821.4/351.1	50	55
氢化可的松 (内标)	[M+H] ⁺	363.2/121.0	120	35
葛根素 (内标)	[M-H] ⁻	415.0/295.0	150	35

2.4.5 方法学考察

(1) 专属性: 分别取大鼠空白血浆、加入混合对照品储备液和内标储备液的空白血浆以及大鼠给药后的血浆样品, 按照“2.4.3”项下方法处理后, 按照“2.4.4”项下分析条件进样分析, 得到 MRM 色谱图, 结果如图 3 所示。各成分分离度良好, 血浆内源性物质对待测成分及内标均无干扰。

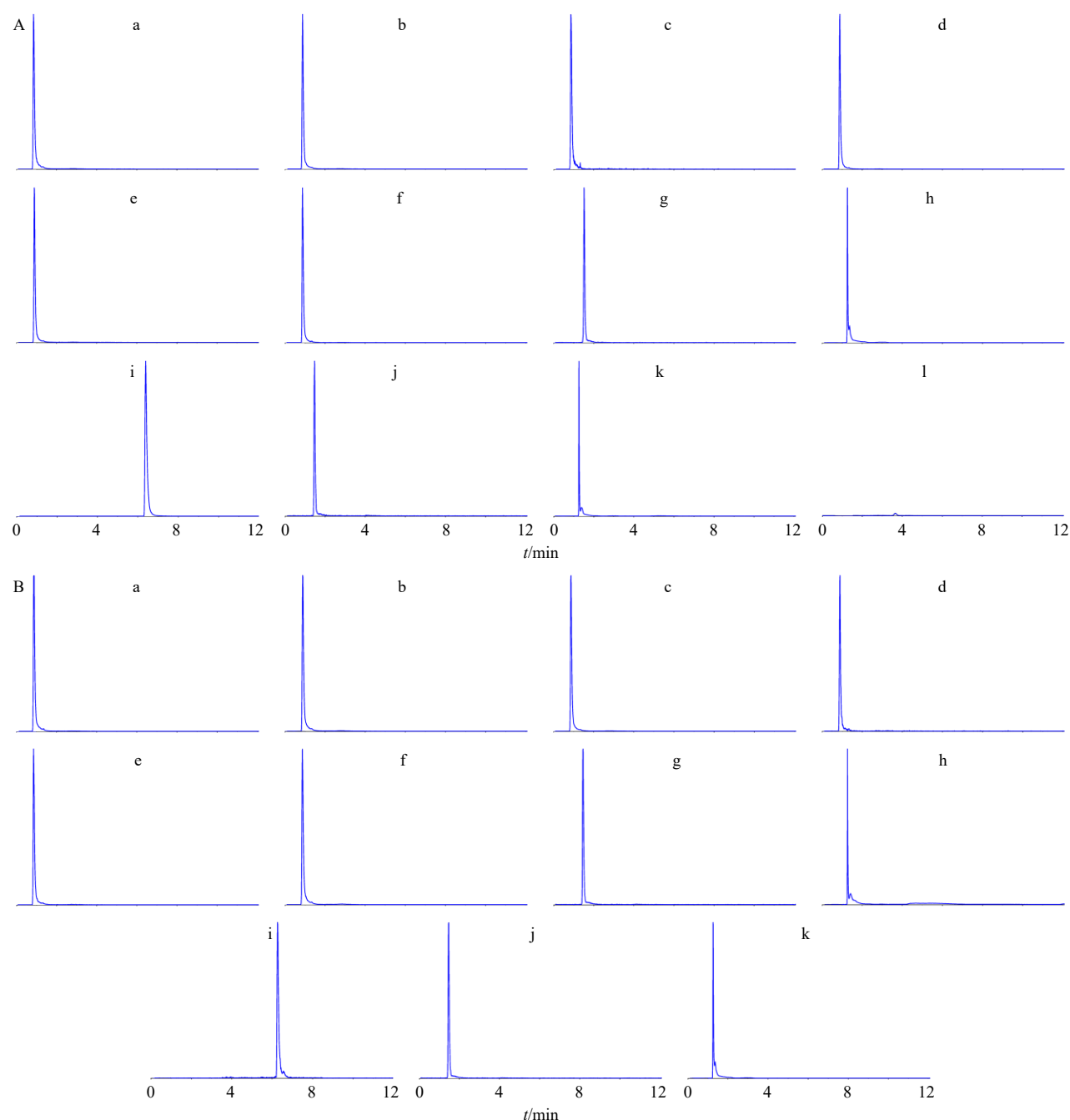
(2) 线性关系考察: 精密吸取“2.4.2 (1)”项下混合对照品储备液, 用甲醇稀释成系列不同质量浓度的混合对照品溶液。按“2.4.3”项下方法处理后, 按照“2.4.4”项下分析条件进行测定。以血浆中待测成分的质量浓度作为横坐标 (X), 待测成分与内标的检测响应值的比值作为纵坐标 (Y), 用最小二乘法进行线性回归, 得各待测成分的线性回归方程、相关系数 (r) 和线性范围, 结果分别为苯甲酰次乌头原碱 $Y=0.0481X-0.0861$, $r=0.9986$, 线性范围 0.08~750.00 ng/mL; 苯甲酰新乌头原碱 $Y=$

$0.1456X+0.6958$, $r=0.9974$, 线性范围 0.09~430.55 ng/mL; 苯甲酰乌头原碱 $Y=0.0333X+0.2445$, $r=0.9982$, 线性范围 1.50~374.55 ng/mL; 次乌头碱 $Y=0.5314X-0.0605$, $r=0.9950$, 线性范围 0.05~18.50 ng/mL; 新乌头碱 $Y=1.2414X+0.0916$, $r=0.9924$, 线性范围 0.12~2.85 ng/mL; 乌头碱 $Y=1.8714X-0.1437$, $r=0.9940$, 线性范围 0.04~3.00 ng/mL; 6-姜酚 $Y=20.0000X+0.0275$, $r=0.9963$, 线性范围 4.36~167 500.00 ng/mL; 甘草苷 $Y=0.0707X-1.2230$, $r=0.9980$, 线性范围 1.95~625.00 ng/mL; 甘草酸铵 $Y=972.7000X+2612.5$, $r=0.9986$, 线性范围 4.63~740.00 ng/mL。

(3) 精密度和准确度: 取“2.4.2 (3)”项下 LLOQ、LQC、MQC、HQC 样品, 按照“2.4.3”项下方法进行处理, 每个质量浓度制备 6 份。按照“2.4.4”项下分析条件于 1 d 内测定, 计算日内精密度和准确度 [准确度是在确定的分析条件下, 测得的样品质量浓度接近真实值的程度, 用相对偏差 (RE) 表示], 连续进样 3 d, 计算日间精密度和准确度。结果见表 7, 结果表明该方法的准确度和精密度良好。

(4) 提取回收率和基质效应: 取“2.4.2 (3)”项下 LLOQ、LQC、MQC、HQC 样品, 按照“2.4.3”项下方法进行处理, 进样测定 6 次, 获得各质量浓度样品的峰面积并计算其均值 (A)。取大鼠空白血浆 150 μL, 按照“2.4.3”项下方法处理后, 残渣分别加入 100 μL LLOQ、LQC、MQC、HQC 样品, 涡旋 3 min, 氮气流下吹干。使用时残渣用 150 μL 70% 甲醇复溶, 混合均匀, 以 13 800× g 离心 10 min, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取上清液进样分析, 获得各质量浓度样品的峰面积并计算其均值 (B), 计算提取回收率 (A/B)。另取 100 μL LLOQ、LQC、MQC、HQC 样品, 按“2.4.3”项下方法处理后, 残渣加入 150 μL 70% 甲醇复溶, 涡旋 3 min, 以 13 800× g 离心 10 min, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取上清液进样分析, 获得各质量浓度样品的峰面积并计算其均值 (C), 计算基质效应 (B/C)。结果见表 8, 结果表明该方法的提取回收率和基质效应符合生物样本分析的要求。

(5) 稳定性: 取“2.4.2 (3)”项下 LLOQ、LQC、MQC、HQC 样品, 按照“2.4.3”项下方法进行处理, 每个质量浓度样品制备 6 份, 分别在室温 (25 ℃) 下放置 12 h、反复冻融 3 次、-80 ℃ 下储存 7 d, 然



a-苯甲酰次乌头原碱; b-苯甲酰新乌头原碱; c-苯甲酰乌头原碱; d-次乌头碱; e-新乌头碱; f-乌头碱; g-6-姜酚; h-甘草苷; i-甘草酸铵; j-正离子内标氢化可的松; k-负离子内标葛根素; l-空白血浆; 图 4 同。

a-benzoylhypaconine; b-benzoylmesaconine; c-benzoylaconine; d-hypaconitine; e-mesaconitine; f-aconitine; g-6-gingerol; h-liquiritin; i-ammonium glycyrrhizinate; j-positive ion internal standard hydrocortisone; k-negative ion internal standard puerarin; l-blank plasma; same as figure 4.

图 3 空白血浆及其中 9 种指标成分及内标的混合样品 (A) 和给药后血浆样品 (B) 的代表性 MRM 色谱图

Fig. 3 Representative MRM chromatograms of blank plasma mixed with nine active ingredients and internal standard (IS) (A) and plasma samples after administration (B)

后进样测定。结果见表 9, 结果表明各样品在 3 种情况下稳定性均良好, 符合生物样本分析的要求。

2.4.6 药动学实验与结果 大鼠分别 ig 给药 SDDT (S11) 和 SDD (S1) 后, 按照所建立的 UPLC-MS/MS 分析方法测定各时间点 9 种指标成分的血药浓度,

绘制平均血药浓度-时间曲线, 结果如图 4 所示。采用 DAS 2.0 软件以非房室模型拟合并计算药动学参数, 结果见表 10。除乌头碱和甘草酸铵盐外, 所有成分的血浆浓度在 1 h 内达到最大值。与 SDD 相比, SDDT 中苯甲酰次乌头原碱和 6-姜酚的达峰时间

表 7 大鼠血浆中 9 种指标成分的日内、日间精密度和准确度 (n = 6)

Table 7 Intra-day and inter-day accuracies and precisions of nine active ingredients in rat plasma (n = 6)													
成分	实际质量浓 度/(ng·mL ⁻¹)	测得质量浓 度/(ng·mL ⁻¹)	日内精密度		日间精密度		成分	实际质量浓 度/(ng·mL ⁻¹)	测得质量浓 度/(ng·mL ⁻¹)	日内精密度		日间精密度	
			RSD/%	RE/%	RSD/%	RE/%				RSD/%	RE/%	RSD/%	RE/%
苯甲酰次乌头原碱	0.08	0.07±0.01	6.07	-6.40	8.49	13.18	乌头碱	0.04	0.04±0.01	9.19	-9.85	13.69	9.86
	65.00	57.87±2.33	4.03	-2.50	8.55	8.43		0.15	0.15±0.02	13.38	5.55	8.97	-12.04
	300.00	287.27±14.92	5.19	-0.73	5.76	-7.76		0.35	0.34±0.02	5.81	8.21	5.54	5.90
	500.00	491.78±29.71	6.04	-5.85	3.36	-2.56		1.45	1.46±0.07	4.46	2.57	3.63	-2.32
苯甲酰新乌头原碱	0.09	0.08±0.01	7.90	-5.50	6.16	10.52	6-姜酚	4.36	12.89±0.45	4.65	1.27	3.53	4.50
	80.00	82.75±1.89	2.28	-6.01	5.50	5.10		3 000.00	3 071.54±155.12	5.05	-3.25	3.96	-1.27
	130.00	128.84±4.07	3.16	2.93	4.31	-3.10		60 000.00	62 049.75±2 520.48	4.06	-1.56	3.11	-0.45
	310.00	318.29±7.74	2.43	-8.36	2.94	4.44		80 000.00	75 374.54±1 508.26	2.00	-2.54	4.95	4.45
苯甲酰乌头原碱	1.50	1.46±0.12	8.15	-4.20	6.21	9.50	甘草苷	1.95	2.00±0.17	8.57	9.18	3.67	8.83
	30.00	29.35±2.22	7.57	7.40	5.55	7.39		165.00	164.37±10.11	6.15	-2.81	4.15	3.95
	60.00	57.28±3.64	6.36	-4.28	3.85	-8.84		250.00	256.83±20.01	7.79	2.97	6.58	2.93
	190.00	193.83±11.34	5.85	-4.39	3.98	-6.23		300.00	296.52±12.18	4.11	-5.41	3.67	1.71
次乌头碱	0.05	0.05±0.01	10.16	9.93	7.99	5.92	甘草酸铵	4.63	4.85±0.08	1.93	1.92	1.96	-2.31
	0.75	0.72±0.06	8.73	-11.94	6.95	10.14		7.40	7.13±0.18	2.55	-1.88	2.50	-5.87
	6.00	5.99±0.09	1.53	-4.21	4.37	0.83		14.80	14.31±0.40	2.76	-3.01	2.68	5.48
	9.00	9.08±0.10	1.06	3.71	3.56	-1.68		592.00	590.41±7.59	1.77	1.13	1.60	3.76
新乌头碱	0.12	0.13±0.01	4.89	11.26	8.11	-9.48							
	0.17	0.16±0.01	9.26	5.67	8.50	-11.94							
	0.54	0.50±0.04	8.36	2.28	10.38	13.47							
	1.30	1.26±0.08	6.01	-1.11	6.17	7.32							

表 8 大鼠血浆中 9 种指标成分的提取回收率和基质效应 (n = 6)

Table 8 Extraction recovery and matrix effect of nine active ingredients in rat plasma (n = 6)											
成分	实际质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	提取回收率/%	RSD/%	基质效应/%	RSD/%	成分	实际质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	提取回收率/%	RSD/%	基质效应/%	RSD/%
苯甲酰次乌头原碱	0.08	92.11	7.76	108.62	7.65	乌头碱	0.04	102.65	3.38	106.62	10.10
	65.00	101.43	6.33	97.23	3.08		0.15	92.51	10.87	95.61	10.43
	300.00	102.79	5.29	93.45	1.87		0.35	103.52	11.61	95.70	14.70
	500.00	95.52	3.24	98.85	0.20		1.45	93.23	3.01	91.94	0.27
苯甲酰新乌头原碱	0.09	102.63	4.58	85.58	0.85	6-姜酚	4.36	97.09	5.16	99.04	3.44
	80.00	96.68	2.38	110.08	3.39		3 000.00	96.36	2.62	93.15	2.50
	130.00	96.47	2.54	94.34	1.00		60 000.00	105.37	3.35	101.23	0.39
	310.00	96.74	2.65	101.62	4.24		80 000.00	92.42	5.57	94.28	1.77
苯甲酰乌头原碱	1.50	105.57	3.98	90.84	5.68	甘草苷	1.95	104.68	4.00	103.28	13.78
	30.00	96.67	2.13	92.02	6.77		165.00	105.76	7.05	101.25	4.44
	60.00	96.95	2.27	102.48	1.44		250.00	97.20	2.71	98.08	9.96
	190.00	104.74	3.82	105.17	0.23		300.00	93.22	2.59	88.42	4.01
次乌头碱	0.05	97.16	4.07	110.19	0.45	甘草酸铵	4.63	101.81	2.78	97.50	13.94
	0.75	104.18	12.76	94.04	11.56		7.40	96.04	2.52	98.76	8.77
	6.00	96.11	7.24	97.07	3.94		14.80	91.67	1.19	103.16	10.72
	9.00	95.95	8.19	98.93	4.85		592.00	93.83	2.95	104.95	11.81
新乌头碱	0.12	105.22	4.98	107.50	6.09						
	0.17	92.72	9.78	96.55	3.46						
	0.54	103.77	4.55	91.55	0.53						
	1.30	93.91	4.44	87.59	0.88						

表 9 大鼠血浆中 9 种指标成分的稳定性 (n = 6)

Table 9 Stability of nine active ingredients in rat plasma (n = 6)

成分	实际质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	25℃放置 12 h		3 次冻融循环		-80℃储存 7 d		成分	实际质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	25℃放置 12 h		3 次冻融循环		-80℃储存 7 d	
		准确度/%	RSD/%	准确度/%	RSD/%	准确度/%	RSD/%			准确度/%	RSD/%	准确度/%	RSD/%	准确度/%	RSD/%
苯甲酰次乌头原碱	0.08	6.86	8.07	10.99	10.85	-13.19	12.84	乌头碱	0.04	-12.45	10.40	12.05	11.86	12.46	14.35
	65.00	-5.88	8.95	-1.56	3.65	4.64	8.04		0.15	14.30	10.00	-13.55	5.31	8.19	7.21
	300.00	-1.62	1.59	-6.17	7.90	1.12	3.04		0.35	9.53	8.24	10.35	13.87	-11.31	13.33
	500.00	2.95	2.69	2.52	4.17	-7.73	2.00		1.45	3.18	8.49	-4.81	1.57	14.33	9.67
苯甲酰新乌头原碱	0.09	-5.96	7.39	12.09	8.68	13.14	9.89	6-姜酚	4.36	-5.46	4.20	6.97	6.64	-3.33	5.51
	80.00	1.84	5.90	-5.06	10.15	5.81	6.73		3 000.00	-6.88	5.15	-5.63	10.15	-8.40	10.15
	130.00	2.14	3.20	9.91	5.14	-5.69	2.73		60 000.00	3.72	2.36	5.55	4.95	5.00	1.53
	310.00	-6.07	5.07	-5.33	8.78	8.35	5.13		80 000.00	5.76	7.68	-4.70	1.55	-5.77	7.15
苯甲酰乌头原碱	1.50	4.67	6.43	11.43	9.72	12.09	10.88	甘草苷	1.95	-9.62	7.70	-8.46	6.57	10.87	10.15
	30.00	9.34	6.77	-3.22	7.95	-6.24	11.21		165.00	4.84	8.98	2.77	4.44	1.44	3.41
	60.00	-8.62	10.81	-4.17	1.95	6.25	6.57		250.00	-4.89	8.27	-4.40	3.55	-6.04	4.44
	190.00	2.03	4.20	6.18	5.44	1.35	3.71		300.00	4.93	6.75	5.05	2.07	4.55	5.61
次乌头碱	0.05	9.39	3.30	10.86	9.65	-8.43	12.15	甘草酸铵	4.63	1.94	1.24	-4.34	2.29	-5.18	1.97
	0.75	4.30	6.96	-5.83	11.76	5.91	10.87		7.40	9.76	2.38	6.29	1.21	5.84	2.78
	6.00	-4.03	2.74	6.68	9.85	-7.68	8.10		14.80	8.57	1.10	12.26	2.00	10.74	0.13
	9.00	0.60	8.42	-2.37	9.13	12.13	11.71		592.00	2.08	0.81	2.95	1.02	5.03	2.08
新乌头碱	0.12	13.89	13.43	7.19	12.50	-12.07	6.89								
	0.17	5.63	8.37	11.71	12.15	12.30	9.74								
	0.54	2.67	8.18	-9.33	9.43	-12.71	7.58								
	1.30	-10.03	10.82	12.18	6.82	-6.73	7.58								

($T_{\max}$) 提前 ($P<0.05$); 苯甲酰次乌头原碱和苯甲酰新乌头原碱的达峰浓度 ($C_{\max}$) 显著提高 ($P<0.01$); 苯甲酰次乌头原碱、6-姜酚、甘草苷的药时曲线下面积 ($AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$) 显著提高 ($P<0.05$ 、 0.001), 相对生物利用度分别提高到 164.94%、136.84%和 114.76%。分散片组中 9 种指标成分其余的药动学参数与四逆汤组相似。

3 讨论

本研究采用粉末直接压片法结合正交设计法优化处方成功制备了 SDDT, 处方工艺稳定, 崩解时间均小于 3 min, 分散均匀性良好。指纹图谱结果显示, 成品中指标成分的波动较小, 稳定可控。药动学结果表明相较于 SDD, SDDT 提高了方中指标成分的体内吸收速度与程度。分散片需要具有一定的硬度以确保在运输和包装过程中不易破碎或磨损, 能维持其外观光洁, 同时又需确保在服用后能迅速崩解^[11]。预实验表明, 低硬度会导致分散片表面粗糙, 易碎; 高硬度会导致压力变大, 崩解时间变长; 硬度在 40 N 左右, 分散片表面光洁, 成型性好, 崩解时间合格, 分散均匀性良好。

崩解剂的种类和用量是影响崩解、分散性能的

关键因素。崩解剂不仅需具备出色的崩解效果, 还需辅助片剂在水中形成稳定的悬浮液。L-HPC 具有较大的表面积和孔隙率, 吸水后导致体积膨胀, 在片剂内部形成多个微小孔隙, 增加水分渗透的通道, 加速崩解过程。PVPP 具有较高的毛细管活性、较大的比表面积和较强的水合作用, 在水分作用下迅速膨胀, 当内部溶胀力超过片剂的硬度时, 会导致片剂迅速崩解。然而, 实验结果显示, 崩解剂的用量过大时反而使分散片崩解缓慢。这可能是因为当水分迅速渗透至片剂内部时, 内部的空气无法及时排出, 阻碍了水分的进一步渗透, 导致其崩解时间延长。此外, 正交设计实验结果显示, PVPP 与 L-HPC 质量比为 1:1 的混合崩解剂效果最好, 制得的分散片外观光洁、色泽均匀, 崩解迅速, 分散均匀性良好。

中药指纹图谱技术能够全面反映中药复方中所含化学成分的种类与数量, 从而提供对中药制剂质量的整体描述和评价。这种整体性和综合性的评价方法, 相较于传统的单一化学成分检测, 更能准确地反映中药复方中多种化学成分的共有特征性^[12-13]。本研究建立了四逆汤的指纹图谱, SDDT、汤剂样品

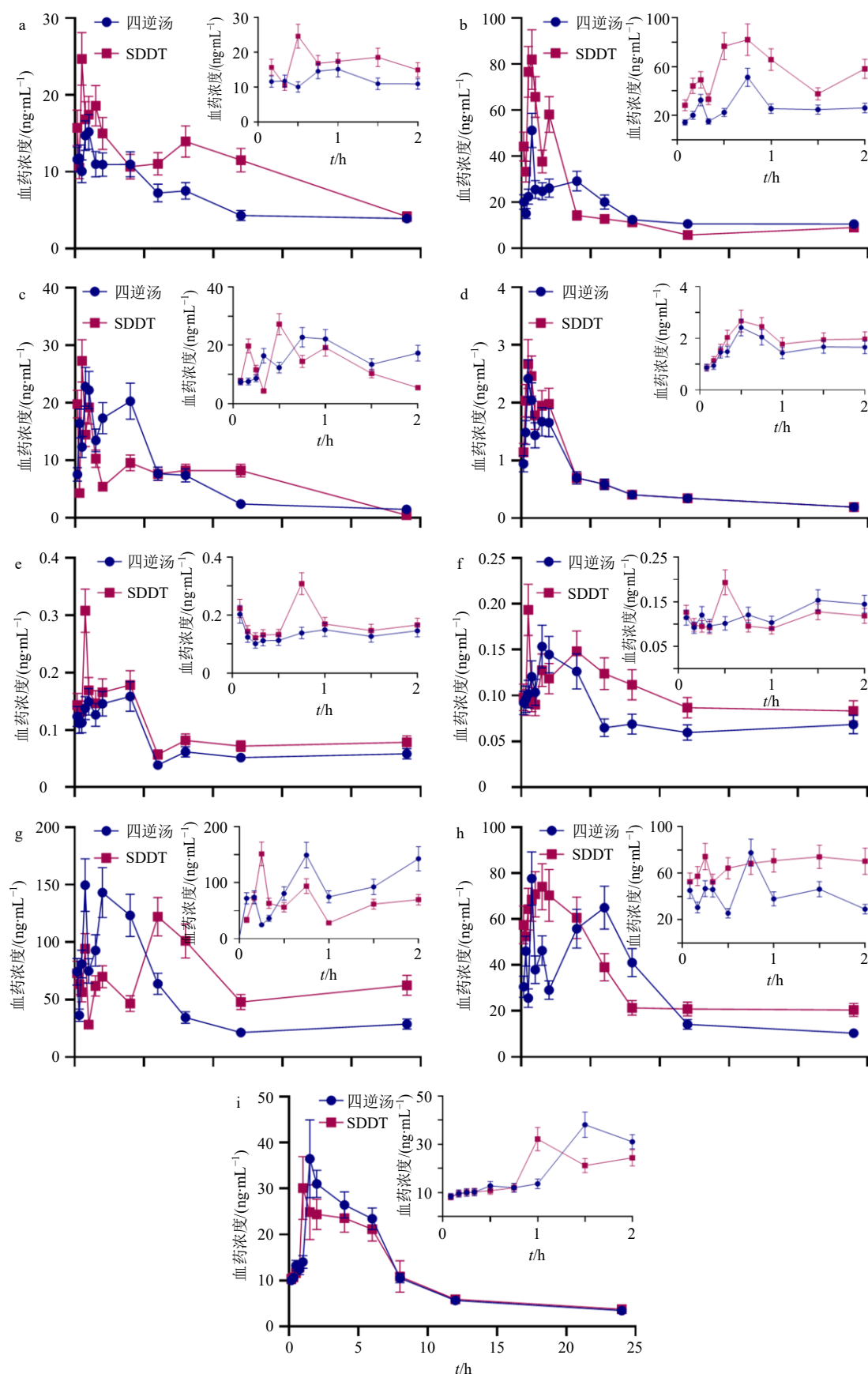


图 4 9 种指标成分在大鼠体内的平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 4 Mean concentration-time curve of nine active ingredients in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

表 10 9 种指标成分的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 10 Pharmacokinetic parameters of nine active ingredients ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	指标成分	$AUC_{0 \sim t}/(\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1})$	$AUC_{0 \sim \infty}/(\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1})$	$MRT_{0 \sim t}/\text{h}$	$MRT_{0 \sim \infty}/\text{h}$	$t_{1/2}/\text{h}$	$T_{\max}/\text{h}$	$C_{\max}/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$
SDD	苯甲酰次乌头原碱	153.97±2.21	163.33±2.72	9.06±0.02	15.37±0.14	6.00±0.05	0.95±0.11	15.40±2.27
	苯甲酰新乌头原碱	361.57±6.72	371.85±8.79	9.35±0.19	16.13±0.61	5.71±0.30	0.80±0.11	53.97±2.82
	苯甲酰乌头原碱	157.31±1.64	157.71±1.58	6.12±0.08	7.11±0.14	2.63±0.08	0.80±0.11	22.62±3.35
	次乌头碱	12.56±1.86	14.26±2.22	7.13±0.06	12.22±0.61	8.48±1.15	0.60±0.14	2.28±0.36
	新乌头碱	1.76±0.27	2.28±1.09	9.77±0.24	16.50±0.64	4.94±0.11	0.85±0.14	0.23±0.08
	乌头碱	1.87±0.27	2.42±0.89	10.49±0.03	21.95±0.19	7.49±0.13	1.60±0.22	0.15±0.02
	6-姜酚	1 173.25±22.59	1 181.51±22.55	8.04±0.16	11.37±0.18	3.29±0.14	0.80±0.11	154.49±8.39
	甘草苷	668.61±11.85	787.48±13.67	7.92±0.08	11.70±1.08	7.03±2.41	0.80±0.11	79.68±1.84
	甘草酸铵	240.91±8.05	270.82±18.73	7.49±0.39	10.77±1.49	6.57±1.65	1.60±0.22	28.75±2.94
SDDT	苯甲酰次乌头原碱	253.96±4.90***	307.53±3.46***	9.26±0.10	14.59±1.46	8.76±0.30	0.55±0.11*	26.39±1.75**
	苯甲酰新乌头原碱	349.97±4.87	364.33±3.15	7.40±0.04	14.09±0.22	6.07±0.24	0.70±0.11	77.67±3.77**
	苯甲酰乌头原碱	160.39±2.33	163.94±2.06	7.92±0.04	8.41±0.07	4.69±0.10	0.60±0.22	25.51±5.06
	次乌头碱	13.48±1.90	15.96±1.45	6.73±0.02	12.86±2.02	9.43±1.89	0.55±0.11	2.61±0.39
	新乌头碱	2.27±0.31	3.77±3.01	10.10±0.08	18.87±0.24	6.07±0.06	0.80±0.11	0.30±0.04
	乌头碱	2.43±0.32	3.07±0.36	10.78±0.22	25.67±3.03	9.78±1.03	0.55±0.11	0.19±0.03
	6-姜酚	1 605.49±11.73***	1 645.28±11.49***	11.39±0.17	21.19±5.44	4.33±0.13	0.35±0.22*	150.61±7.78
	甘草苷	767.27±22.60***	805.20±15.89*	8.86±0.21	15.03±0.94	5.50±0.40	0.75±0.68	80.42±5.21
	甘草酸铵	255.12±13.49	295.86±10.68	7.45±0.34	11.23±1.20	7.50±0.84	1.10±0.22	33.44±2.27

与 SDD 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs SDD group.

的相似度均在 0.9 以上,表明 2 种剂型指纹图谱具有高度的相似性,且组间与组内批间指标成分差异均较小,表明分散片的工艺稳定性和可控性良好。

中药新制剂的开发过程中,多成分药动学的研究是关键的一环。在四逆汤的成分中,生物碱被认为是重要指标成分。其中的单酯型二萜类生物碱,如苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱,具有抗心肌缺血、心律失常和抗炎镇痛等作用^[14];然而,其中的双酯型生物碱,如次乌头碱、新乌头碱、乌头碱,具有较强的毒性,使得其治疗窗较为狭窄^[15]。此外,来自干姜的 6-姜酚与来自甘草的甘草苷和甘草酸,不仅可改善附子中二萜类生物碱的毒性,也具有较好的抗心律失常、抗氧化作用^[16-17]。因此,本实验重点关注前述 9 种指标成分的药动学参数变化。结果显示, SDDT 中苯甲酰次乌头原碱、6-姜酚的 $T_{\max}$ 提前,苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱的 $C_{\max}$ 与苯甲酰次乌头原碱、6-姜酚和甘草苷的 $AUC_{0 \sim t}$ 较四逆汤有所提高,其余成分的药动学参数 $AUC_{0 \sim t}$ 、 $MRT_{0 \sim \infty}$ 、 $t_{1/2}$ 、 $T_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 与四逆汤的接近。此外,乌头类生物碱和甘草苷的平均血药浓度-时间曲线均呈双峰现象(图 4),这提示,可能存在肠肝循环、重吸收等相关影响因

素^[18-19]。单酯型生物碱的 $C_{\max}$ 低于对应的双酯型生物碱的 $C_{\max}$,主要原因可能是大鼠 ig 给药后,双酯生物碱在体内水解、转化为单酯生物碱^[20]。

本研究通过正交设计优化处方,采用直接压片法成功制备了 SDDT, SDDT 最优处方中四逆汤浸膏粉、PVPP、L-HPC、甘露醇与硬脂酸镁的质量比为 50.0:5.0:5.0:38.5:1.5。SDDT 与汤剂的指纹图谱相似度较高,说明制备过程对其指标成分的影响较小。药动学研究结果表明, SDDT 可提高 9 种指标成分的体内吸收速度和程度,可为该制剂的临床应用提供参考依据。但本实验对于该制剂的药效学、药理机制及其临床应用的安全性研究尚未开展,后续有待完善。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 周毅萍,何新慧.柯雪帆教授《伤寒论》学术思想辑要[J].上海中医药大学学报,2012,26(4):3-6.
- [2] Zhang Z, Chen F, Wan J J, et al. Potential traditional Chinese medicines with anti-inflammation in the prevention of heart failure following myocardial infarction[J]. Chin Med, 2023, 18(1): 28.
- [3] 董育瑄,王妍,洪燕龙,等.提高中药固体制剂载药量

- 的意义与途径 [J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(3): 420-427.
- [4] Hu Q, Chen M, Yan M M, *et al.* Comprehensive analysis of Sini Decoction and investigation of acid-base self-assembled complexes using cold spray ionization mass spectrometry [J]. *Microchem J*, 2022, 173: 107008.
- [5] 杨莎莎, 林夏, 黄友, 等. 经典名方关键质量属性及影响因素分析 [J]. 中草药, 2023, 54(4): 1274-1284.
- [6] 李萱, 丁珂, 杨挡, 等. 蒲地蓝消炎口服液中黄芩提取工艺优化及其性质、含量及药动学研究 [J]. 中草药, 2023, 54(10): 3101-3108.
- [7] 田锁燕, 贾国香, 胡静雯, 等. 基于生理学的药动学/生物药剂学模型在中药药动学研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6903-6912.
- [8] 范林乾. 四逆汤煎煮技术规范研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2012.
- [9] 彭伟, 刘冬梅, 傅舒, 等. 基于代谢组学的四逆汤中附子-干姜药对配伍前后毒效变化规律分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(18): 126-136.
- [10] 韩晴晴. 四逆汤对心肌梗死后慢性心衰大鼠心功能和氧化应激的作用研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [11] 刘畅, 马延力. 山楂丹参分散片的制备工艺研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2024, 51(6): 151-155.
- [12] 廖嘉穗, 付娟, 张日美, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学及多成分定量测定的腰痹通胶囊质量评价研究 [J]. 中草药, 2024, 55(8): 2579-2588.
- [13] 韩美欣, 张晨阳, 佟红娜, 等. HPLC 指纹图谱和 UPLC-Q-TOF-MS 方法对芪冬颐心口服液中成分研究 [J]. 中草药, 2022, 53(24): 7679-7685.
- [14] Cui Y D, Liu Q M, Zhang Q Q, *et al.* Benzoylaconine protects skeletal muscle against ischemia-reperfusion injury through activation of IF1-dependent AMPK/Nrf2 axis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2024, 18: 2125-2142.
- [15] Ni L L, Miao P, Jiang J, *et al.* Glycyrrhiza uralensis promote the metabolism of toxic components of *Aconitum carmichaeli* by CYP3A and alleviate the development of chronic heart failure [J]. *PLoS One*, 2022, 17(6): e0270069.
- [16] Zhang M, Peng Y, Wang M Y, *et al.* The influence of compatibility of Si-Ni Decoction with metabolism in intestinal bacteria on transports of toxic diterpenoid alkaloids from processed aconite root across Caco-2 monolayers [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 228: 164-178.
- [17] Peter K, Schinnerl J, Felsinger S, *et al.* A novel concept for detoxification: Complexation between aconitine and liquiritin in a Chinese herbal formula ('Sini Tang') [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 149(2): 562-569.
- [18] Fan B L, Xu S, Bi J L, *et al.* Simultaneous determination of six alkaloids in rat plasma by SPE-HPLC-MS/MS and their pharmacokinetics after oral administration of *Radix Aconiti Preparata* extract [J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2021, 4(1): 118-127.
- [19] 张爱杰, 李偲, 刘羽康, 等. 甘草苷体内暴露特征及体外跨膜转运机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(7): 2053-2061.
- [20] Tang M H, Peng F L, Liu X X, *et al.* Comparative pharmacokinetic investigation on multiple active aminoalcohol-diterpenoid alkaloids after single oral administrations of monomers and aqueous extract of Fuzi (*Aconiti Lateralis Radix Praeparata*) by UFLC-MS/MS [J]. *Planta Med*, 2023, 89(5): 561-570.

[责任编辑 郑礼胜]