

· 论著 ·

红景天苷单体与坤复康片大鼠口服药动学特征的比较

刘昕竹¹, 徐人杰^{1,2}, 冯 城², 魏 昕¹ (1. 上海交通大学医学院附属新华医院药学部, 上海 200092; 2. 绍兴市妇幼保健院临床药理学室, 浙江 绍兴 312000)

[摘要] 目的 研究红景天苷单体和坤复康片在大鼠体内的药动学特征, 探讨药物配伍对红景天苷单体在大鼠体内过程的影响。方法 用LC/MS/MS法测定红景天苷和坤复康片在大鼠体内的血药浓度, 估算两者的药动学参数。结果 红景天苷和坤复康在大鼠体内主要药动学参数 AUC_{0-t} 分别为 (587.11 ± 35.02) 和 (956.35 ± 47.65) ng·h/ml; c_{max} 分别为 (85.81 ± 15.66) 和 (143.86 ± 46.91) ng/ml, 两者有显著差异。结论 坤复康片中的其他成分会影响红景天苷的吸收、分布和排泄。

[关键词] 坤复康; 红景天苷; 口服; 药动学

[中图分类号] R969.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2021)01-0049-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202006043

Comparison of the pharmacokinetic characteristics of pure salidroside and Kunfukang pills after oral administration

LIU Xinzhu¹, XU Renjie^{1,2}, FENG Cheng², WEI Xin¹ (1. Department of Pharmacy, Xinhua Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China; 2. Department of Clinical Pharmacy, Shaoxing Women and Children's Hospital, Shaoxing 312000, China)

[Abstract] **Objective** To study the pharmacokinetic differences of pure salidroside and Kunfukang pills in rats and explore the pharmacokinetic changes of salidroside as a pure form or in the mixture. **Methods** The rats were divided into two groups. One group received pure salidroside and the other was administrated with kunfukang pills. Concentrations of salidroside in both groups were determined by LC/MS/MS method. The main pharmacokinetic parameters were calculated. **Results** AUC_{0-t} of salidroside was (587.11 ± 35.02) in pure salidroside group and (956.35 ± 47.65) ng·h/ml in Kunfukang group. c_{max} was (85.81 ± 15.66) and (143.86 ± 46.91) ng/ml separately, with significant difference. **Conclusion** The results indicated that other components in kunfukang pills had influence on the absorption, distribution and elimination of salidroside.

[Key words] Kunfukang; salidroside; oral administration; pharmacokinetics

中药及其制剂由于其特殊的功效, 低毒性和较少的副作用而在世界范围内越来越流行^[1]。坤复康片是著名的中药配方, 包括赤芍、苦参、香附、猪苓、女贞子、南刘寄奴、乌药、粉萆解、扁蓄, 临床用于治疗中国女性的盆腔炎^[2-3]。红景天苷(图1)是坤复康片抗炎作用的重要生物活性化合物。研究证明, 红景天苷包含许多药理作用, 例如抗血栓^[4]、抗成骨细胞凋亡^[5]、保肝^[6]和抗肿瘤^[7]。

中药药动学研究不仅可以解释和预测有关功

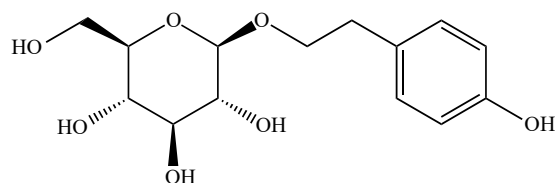


图1 红景天苷结构式

效和安全性的药物事件, 而且还有助于评估处方或者中草药的合理性和相容性^[8-10]。口服是应用中药的主要途径, 并通过口服发挥药理作用。但是, 口服坤复康片后, 红景天苷的药动学特征尚未见报道。同时, 坤复康片中其他成分对红景天苷吸收的影响目前也未被揭晓。

我们旨在开发一种选择性高、灵敏且快速的UPLC-MS/MS方法, 用于测定大鼠血浆中的红景天苷。随后, 本方法成功地用于该活性成分在大鼠体内的药动学研究。同时, 通过比较大鼠口服给予

[基金项目] 上海交通大学医学院医院药学科研基金(JDYX2017QW005); 上海交通大学医学院附属新华医院院基金(XH2053)

[作者简介] 刘昕竹, 硕士, 主管药师, 研究方向: 临床药学, Email: liuxinzhu@xinhumed.com.cn

[通信作者] 魏 昕, 硕士, 主管药师, 研究方向: 临床药学, Email: weixin@xinhumed.com.cn, Tel: (021)25077155

红景天苷单体和坤复康片后的药动学行为,我们探究了坤复康片对红景天苷药动学特征的影响。

1 材料

1.1 药品与试剂

红景天苷标准品和内标葛根素标准品(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。甲醇、乙腈均为色谱纯;水为纯化水;坤复康片为市售品(薄膜衣片,规格:0.4 g/片,批号:20190610);空白大鼠血浆取自健康 Wistar 大鼠,用前经检测对实验无干扰。

1.2 动物

Wistar 雄性大鼠(180~220 g,上海交通大学公共实验室)。

1.3 仪器

Applied Biosystem 5500 QTRAP® hybrid triple-quad LC/MS/MS(美国 AB 科学技术公司);ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(美国安捷伦科技有限公司,50 mm×2.1 mm,1.8 μm)。

2 方法

2.1 色谱条件

流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸(B)。梯度洗脱:0.0~2.4 min,1.0%~23.4% A;2.4~2.5 min,23.4%~95.0% A;2.5~3.5 min,95.0% A;3.5~3.6 min,95.0%~1.0% A;3.6~4.6 min,1.0% A。用前经 0.22 μm 微孔滤膜过滤。在线脱气;流速:0.4 ml/min;柱温:30 °C;进样量:2 μl。

2.2 质谱条件

ESI 离子源:负离子模式;采集方式:多反应监测(MRM);离子化温度(TEM):550 °C;喷雾电压:-4 500 V;雾化气(GS1):50 psi;辅助气(GS2):50 psi;气帘气(CUR):50 psi。红景天苷 m/z 299.2 → 59.0,内标葛根素 m/z 415.1 → 267.1,碰撞能量(CE):-29 V(红景天苷),-40 V(葛根素)。

2.3 标准溶液的配制

精密称取红景天苷对照品适量,加水定容至 10 ml 制成对照品溶液,浓度为 100 μg/ml,4 °C 冷藏备用。

2.4 血浆样本处理

取血浆样品 50 μl,加入 70 ng/ml 葛根素内标溶液 10 μl,涡旋混匀,加入 400 μl 甲醇,涡旋提取 1 min。12 000 r/min 离心 10 min,吸取 2 μl 上清液进样 LC-MS/MS 分析。

2.5 方法学考察

根据 FDA 发布的生物分析方法标准,设定红

景天苷 3 个质控浓度(5、50、200 ng/ml),通过将标准溶液用空白血浆稀释的方式配制质控样本,对方法的专属性、精密度、准确性、稳定性、提取回收率、线性关系进行了考察(FDA,2001 年)。验证试验连续进行 3 d。每次验证均重复 6 份质控样品。

2.6 试验设计

12 只雄性 Wistar 大鼠,随机分为 2 组,适应性饲养 3 d 后,于实验前 12 h 禁食,自行饮水。红景天苷单体和坤复康片事先用 0.5% 羧甲基纤维素钠制成混悬液,2 组大鼠分别灌胃给予红景天苷单体和坤复康片混悬液,剂量分别为 0.95 和 120 mg/kg。其中,坤复康片剂量为单次口服临床等效量。大鼠于给药前和给药后 0、0.17、0.5、1、2、3、4、6、8、12、24、48 h 眼眶取全血 150 μl,立即置于含肝素的试管中,摇匀,12 000 r/min 离心 10 min,分离血浆 50 μl,-20 °C 保存,备测。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 专属性

在本研究中,我们尝试了各种流动相条件以获得分析物的最佳响应、合适的保留时间和良好的峰形。主要测试了甲醇、乙腈、0.1% 甲酸和 100% 水作为潜在的流动相。结果表明,0.1% 甲酸和甲醇作为流动相可以产生更高的响应和更好的峰形。因此,选择了甲醇-0.1% 甲酸水。对于 MS 条件,测试了正扫描和负扫描模式。由于处于负离子模式的红景天苷显示出更明显的碎片特征和更高的灵敏度,因此选择了该模式。空白血浆、红景天苷和内标血浆的典型色谱见图 2。其中,红景天苷和内标保留时间分别为 1.52 和 1.98 min。在空白血浆中,没有发现内源性物质干扰红景天苷的分析。

3.1.2 提取回收率试验

于空白大鼠血浆中加入对照品溶液配制成(5、50、200 ng/ml)3 种浓度的对照品血浆溶液,每个浓度平行为 6 份,按“血浆预处理方法”项处理,进样,测定峰面积 A_1 。另取 6 份空白大鼠血浆,按“血浆预处理方法”项处理后,加入按对照品溶液配制成(5、50、200 ng/ml)3 种浓度的对照品血浆溶液,每个浓度平行为 6 份,进样,测定峰面积 A_2 。计算 A_1/A_2 为提取回收率,分别为(87.2±6.2)%、(85.1±4.4)%、(90.4±7.1)%。内标葛根素的提取回收率为(91.2±5.9)%。结果表明红景天苷的提取回收率较高,且稳定。

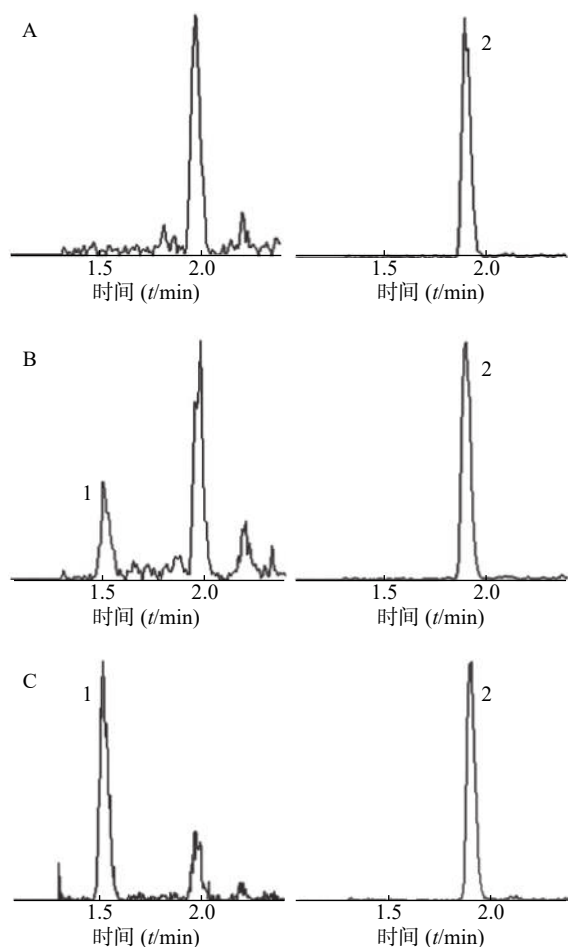


图2 红景天苷在血浆中的LC/MS/MS图

A.空白血浆+内标; B.空白血浆+红景天苷+内标; C.大鼠口服坤复康混悬液后血浆样本; 1.红景天苷; 2.内标

3.1.3 精密度与准确性试验

制备高、中、低浓度的质控样品,按“2.4”项下方法提取后进样分析。在3 d内测定日内精密度,通过准备各浓度下6份重复样本来评估日间精密度。从标准曲线计算出质控样品浓度,并对质控样品结果进行方差分析以获得精确度和准确性。结果见表1。几组样本的标准偏差和相对误差均在合理范围内,表明红景天苷的精密度和准确性良好。

表1 血浆质控样品的精密度与准确性 (n=6)

浓度(ng/ml)	标准偏差(%)		相对误差(%)	
	日内	日间	日内	日间
5	2.74	4.76	-8.51	2.36
50	4.33	3.59	4.84	-4.55
200	4.29	1.98	3.57	-2.18

3.1.4 线性关系考察

取空白大鼠血浆适量,配成含红景天苷4、5、

10、20、50、100、200、500 ng/ml的标准空白血浆系列溶液。按“2.4”项下提取,每个浓度平行测定6份样本。以待测物红景天苷浓度为横坐标,待测物与内标葛根素峰面积的比值为纵坐标,进行线性回归,权重系数为 $1/C^2$,计算直线回归方程。红景天苷标准曲线为: $Y=0.0395X-0.0131$ 。其中, X 为红景天苷的浓度(ng/ml), Y 为红景天苷和内标质谱峰面积的比值。线性范围为4~500 ng/ml,红景天苷定量限为4 ng/ml。

3.1.5 稳定性试验

分别取低、中、高3个浓度的质控样本各6份,测定反复冻融3次、 -20°C 存放2周、室温(20°C)下存放4 h、自动进样器(4°C)保存24 h后药物的浓度,考察冻融和存放时间对红景天苷稳定性的影响,试验结果表明:红景天苷在上述条件下稳定,不影响测定结果。结果见表2。

表2 红景天苷在大鼠血浆中的稳定性 (n=6)

条件	浓度(ng/ml)		标准偏差(%)
	加入量	测得量	
3次冻融	5	4.77	6.53
	50	44.53	4.12
	200	189.22	7.46
-20°C 冷冻20 d	5	4.74	8.25
	50	45.12	4.37
	200	190.98	8.33
室温下(20°C)存放4 h	5	4.76	2.56
	50	44.43	6.87
	200	188.23	5.53
自动进样器(4°C)存放24 h	5	4.72	8.12
	50	46.33	7.97
	200	189.23	6.63

3.2 药动力学试验

该方法用于大鼠口服红景天苷单体和坤复康片的药动力学研究。图3和表3给出了通过DAS 2.0计算两组大鼠的平均浓度-时间曲线及其药动力学参数的数据。浓度-时间曲线见图3。与红景天苷单体组相比,坤复康片组中 c_{max} 、 AUC_{0-t} 和 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 的水平显著增加。

4 讨论

本实验建立了新的血浆中红景天苷的LC/MS/MS测定方法,方法简单方便易行,分离效率高,专

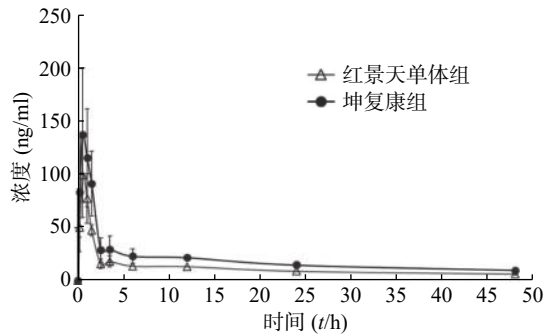


图3 大鼠灌胃红景天苷单体和坤复康混悬液后红景天苷血药浓度均值-时间曲线 ($n=6$)

表3 红景天苷大鼠体内药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	红景天苷单体组	坤复康片组
$t_{1/2}$ (t/h)	36.08±6.63	27.44±9.87
MRT (t/h)	16.11±0.82	15.97±0.61
CL[L/(kg·h)]	0.022±0.003	0.016±0.003
c_{max} (ng/ml)	85.81±15.66	143.86±46.91*
AUC_{0-t} (ng·h/ml)	587.11±35.02	956.35±47.65**
$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/ml)	917.61±121.43	1 296.47±249.32*
t_{max} (t/h)	0.50±0.00	0.83±0.47

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与红景天苷单体组比较。

属性强, 血浆中杂质或内源性物质对待测物均不产生干扰, 保留时间短、灵敏、稳定可靠, 适用于针对红景天苷大鼠血浆样本的批量检测。

实验结果显示, 给大鼠分别予红景天苷单体和坤复康片灌胃后, 红景天苷的一些药动学特征, 如 $t_{1/2}$ 、MRT在两组中未见差异, 说明复方中其他成分可能对红景天苷的体内消除过程影响较小。另一方面, 部分药动学参数显示出显著差异, 主要表现为两组 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 c_{max} 均有显著差异, 表明复方给药增加了红景天苷吸收入体内的血药浓度和体内暴露量, 提示该复方成分对红景天苷有增加吸收的作用。该结果证明了方剂配伍可明显影响彼此在体内化学成分的药动学参数, 说明在中医辨证理论指导下的复方配伍原则具有丰富的科学内涵。

根据文献[11]报道, 除红景天苷外, 坤复康片主要还包括氧化苦参碱、苦参碱、芍药内酯苷、芍药苷及苯甲酰芍药苷等若干种成分, 复方中几味药材间存在复杂的相互作用, 从而可能导致药效发生改变, 值得我们进一步深入研究。

【参考文献】

- [1] YUAN G, ZHANG R, LI X, et al. Simultaneous HPLC-MS determination of loganin, morroniside and paeoniflorin in rat plasma; pharmacokinetics of Liuwei Dihuang Pills[J]. Ind J Pharm Sci, 2018, 81(1): 129-137.
- [2] 赵子剑, 陈迪钊. 坤复康胶囊对慢性盆腔炎大鼠细胞因子的影响实验[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(12): 3054-3055.
- [3] 卫吴, 侯建平, 郭惠玲, 等. 坤复康胶囊对混合菌液致盆腔炎模型大鼠血液流变学和病理形态学的影响[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(3): 92-94.
- [4] 林晓坚, 袁兆伟, 潘彩燕, 等. 红景天苷体外抗血栓作用的实验研究[J]. 贵州医科大学学报, 2018, 36(6): 551-553.
- [5] 夏永严. 红景天苷通过bFGF、VEGF抵抗成骨细胞凋亡的研究[J]. 河北医药, 2020, 42(9): 1399-1407.
- [6] 叶倩男, 徐列明, 平键. 红景天苷保肝作用及相关机制的研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2020, 34(1): 83-87.
- [7] 常娜, 王小平, 胥冰. 红景天苷抗肿瘤机制的研究概况[J]. 吉林中医药, 2019, 39(10): 1391-1393.
- [8] SHI M, XIONG K, ZHANG T, et al. Pharmacokinetics and metabolic profiles of swertiamarin in rats by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 179: 112997.
- [9] LIU L, CUI ZX, YANG XW, et al. Simultaneous characterisation of multiple Mahonia fortunei bioactive compounds in rat plasma by UPLC-MS/MS for application in pharmacokinetic studies and anti-inflammatory activity in vitro[J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 179: 113013.
- [10] GUO D, DANG J, YANG H, et al. Simultaneous determination of four flavonoids in rat plasma after oral administration of Malus hupehensis (Pamp.) Rehd. extracts by UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetics study[J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 177: 112869.
- [11] 赵莹. HPLC-MS/MS法同时测定坤复康片中5种有效成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2015, 32(11): 869-974.

[收稿日期] 2020-06-10 [修回日期] 2020-10-10

[本文编辑] 李睿旻