

参附注射液五种活性成分在正常和慢性心力衰竭大鼠的药动学研究

李燕, 党珏, 曹小玉, 李芸霞*, 彭成*

成都中医药大学药学院 中药材标准化教育部重点实验室 中药资源系统
研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137

摘要: 比较参附注射液中五种人参皂苷活性成分在正常和慢性心力衰竭两种模型大鼠体内的药动学过程。取SD大鼠6只以盐酸阿霉素复制慢性心力衰竭模型, 作为模型组; 另取6只大鼠给药等体积生理盐水, 作为正常组。分别对两组尾静脉注射参附注射液, 制备血浆样品, UPLC-DAD法测定五种人参皂苷成分的血药浓度, WinNonlin6.3软件计算药动学参数并进行比较。发现给药后模型组大鼠体内的人参皂苷 R_{g_1} 、 R_e 、 R_{b_1} 、 R_c 和 R_d 的 C_{max} 、 AUC_{last} 明显升高, Cl/F 明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明慢性心力衰竭会影响大鼠体内参附注射液的五种人参皂苷成分的药动学特征。

关键词: 参附注射液; 活性成分; 人参皂苷; 慢性心力衰竭; 药动学

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.3.021

Pharmacokinetic Study on Active Ingredients of Shenfu Injection in Normal and Chronic Heart Failure Rats

LI Yan, DANG Jue, CAO Xiao-yu, LI Yun-xia*, PENG Cheng*

Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, The Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources Co-founded by Sichuan Province and MOST, Chengdu 611137, China

Abstract: To compare the pharmacokinetics of active ingredients of five ginsenosides in Shenfu Injection in normal and chronic heart failure rats. Six SD rats were given doxorubicin hydrochloride to establish the model of chronic heart failure as the model group. Another six SD rats were given isometric normal saline as the control group. Shenfu Injection was given to rats of each group, respectively. After preparation of plasma samples, the plasma concentration of five kinds of ginsenosides was determined by means of UPLC-DAD method. The pharmacokinetic parameters were calculated by WinNonlin6.3 software, and then it was compared. The results showed that the C_{max} and AUC_{last} of ginsenoside R_{g_1} , R_e , R_{b_1} , R_c and R_d were significantly higher in the model group than that in the normal group after administration. Compared with the normal group, the Cl/F was significantly decreased in the model group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The pharmacokinetic characteristics of five ginsenosides of Shenfu Injection in rats *in vivo* can be affected by chronic heart failure.

Key words: Shenfu Injection; active ingredients; ginsenosides; chronic heart failure; pharmacokinetics

慢性心力衰竭是各种心脏疾病导致心功能不全的一种复杂的临床综合征, 是心室泵血能力下降, 不能满足机体代谢需要的疾病。慢性心力衰竭是大多数心血管疾病的最终归宿, 是最主要的死亡原

因^[1]。其病死率高, 发病率逐年增长, 严重影响患者的生命健康^[2,3]。参附注射液为益气回阳的要方, 对阳气亏虚之证有较好的改善作用^[4], 方中两药相须为用, 可峻补心肾之虚阳, 化阴寒之水气^[5], 临床常用于治疗慢性心力衰竭。

参附注射液中人参为君药, 附子为臣药, 人参的主要活性成分为人参皂苷, 包括人参皂苷 R_{g_1} 、 R_e 、 R_{b_1} 、 R_c 、 R_d 等, 其也是参附注射液的主要标志性成分。当前, 关于参附制剂某些成分的药动学特征已

收稿日期: 2017-06-16 接受日期: 2017-11-15

基金项目: 国家自然科学基金(81373943, 81573583, 81630101); 国家发改委项目(ZYBZH-C-SC-51); 四川省科技厅省青年科技创新研究团队专项(2017TD0001)

* 通信作者 E-mail: lyxcdutcm@126.com

有一些报道^[6],但少见同时检测多种人参皂苷类成分以及参附注射液在不同模型下的药动学差异的报道。因此,本实验在前期建立人参皂苷 R_g₁、R_e、R_b₁、R_c、R_d 的 UPLC-DAD 检测方法的基础上,首次探讨参附注射液的上述五种活性成分在正常和慢性心力衰竭两种大鼠体内的药动学过程,并进行药动学比较,为临床指导用药提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 SD 大鼠,体重(200 ± 20)g,雌雄各半,由成都中医药大学实验动物中心提供,检疫后用,许可证号:SYXK(川)2014-124。动物实验环境:成都中医药大学国家中医药管理局中药药理科研三级实验室。

1.2 药物与试剂

参附注射液,由雅安三九药业有限公司提供,批号:131110050。人参皂苷 R_g₁ (批号 MUST-13041301)、R_e (批号 MUST-13041201)、R_b₁ (批号 MUST-13102301)、R_c (批号 MUST-15011912)、R_d (批号 MUST-15020910),均由成都曼斯特生物科技有限公司提供;甘草苷(内标,批号 131127,成都克洛玛生物科技有限公司),盐酸阿霉素(批号 1407E1,由深圳万乐药业有限公司)。色谱乙腈(批号 CAS75-05-8),色谱水(批号 138683),均由美国 Fisher 公司提供;其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器与检测条件

1260 型超高效液相色谱仪(UPLC-DAD,美国安捷伦科技有限公司);色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ column(4.6 × 150 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min,19% A;10 ~ 36 min,19% ~ 30% A;36 ~ 40 min,30% ~ 40% A;40 ~ 53 min,40% A),流速为 0.5 mL/min,进样量为 10 μL,分析时间为 53 min,后运行时间为 3 min,柱温为 35 °C,波长为 203 nm。十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司);KQ-5200E 型超声清洗波器(昆山市超声仪器有限公司);Vortex-Genie 2 涡旋振荡器(美国 Scientific Industries 公司);TG16-WS 型台式高速离心机(长沙湘仪离心机有限公司);MD200-1 型氮气吹扫仪(杭州奥盛仪器有限公司);200 μL、1000 μL 移液器等(德国 Eppendorf 公司);-80 °C 超低温冰箱(日本三洋电机公司)。

1.4 方法

按照相关文献方法制备大鼠慢性心力衰竭模型^[7,8]:将盐酸阿霉素用生理盐水配制成 2 mg/mL 的溶液,按 2 mL/kg 体重给 6 只健康合格的 SD 大鼠腹腔注射,每周一次,连续 6 周,复制大鼠慢性心力衰竭模型,作为模型组;另取 6 只 SD 大鼠按 2 mL/kg 体重腹腔注射生理盐水,每周一次,连续 6 周,作为正常组。再分别对正常组和模型组尾静脉注射 3.2 mL 参附注射液,然后在给药后(2、10、20、30、60、120、300、480、720、1440 min)共 10 个时间点眼眶内眦静脉取血 0.5 mL,于 4 °C、3500 rpm 离心 10 min,分离血浆于 -80 °C 冷冻保存。取 200 μL 血浆加入 1.5 mL 的 Eppendorf 管中,加入 10 μL 内标,涡旋振荡 30 s,再加入 100 μL 的 10% 氨水,600 μL 甲醇,涡旋振荡 5 min,12000 rpm 离心 10 min,取上清液于 30 °C 水浴氮气吹干,残渣加 100 μL 的流动相溶解,涡旋振荡 5 min,12000 rpm 离心 10 min,取 10 μL 上清液进行检测。

分别精密称取适量人参皂苷 R_g₁、R_e、R_b₁、R_c、R_d 和内标,用甲醇溶解分别配制成 1250、500、500、125、125 μg/mL 的对照品储备液和 98 μg/mL 的内标,于 4 °C 冰箱中冷藏。分别取适量储备液用流动相(水:乙腈 = 81:19)稀释为混合标液 1、2、3、4、5、6、7、8,其中人参皂苷 R_g₁ 的浓度分别为:0.40、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00、25.00 μg/mL;人参皂苷 R_e 的浓度分别为:0.20、0.40、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00、25.00 μg/mL;人参皂苷 R_b₁ 的浓度分别为:2.00、4.00、8.00、10.00、16.00、62.50、125.00、250.00 μg/mL;人参皂苷 R_c 的浓度分别为:1.00、2.00、4.00、8.00、16.00、25.00、50.00、100.00 μg/mL;人参皂苷 R_d 的浓度分别为:0.50、2.00、4.00、8.00、16.00、25.00、50.00、100.00 μg/mL;内标:30 μg/mL。分别精密吸取上述 8 组标准溶液制备血浆样品,以待测物峰面积和内标峰面积的比 Y 为纵坐标,以待测物浓度 X 为横坐标,得回归方程: $y_{R_{g1}} = 0.0978x - 0.0131$ ($r^2 = 0.9996$),线性范围 0.16 ~ 10.00 μg/mL; $y_{R_e} = 0.0756x - 0.0045$ ($r^2 = 0.9995$),线性范围 0.08 ~ 10.00 μg/mL; $y_{R_{b1}} = 0.0480x + 0.0126$ ($r^2 = 0.9997$),线性范围 0.80 ~ 100.00 μg/mL; $y_{R_c} = 0.0629x - 0.0010$ ($r^2 = 0.9992$),线性范围 0.40 ~ 40.00 μg/mL; $y_{R_d} = 0.0642x - 0.0066$ ($r^2 = 0.9991$),线性范围 0.20 ~ 40.00 μg/mL。另外,选择 3 个混合标准溶液(其中,人参皂苷

Rg₁, Re, Rb₁, Rc, Rd 的浓度依次为: 1.00、1.00、8.00、4.00、4.00 μg/mL, 8.00、8.00、62.50、25.00、25.00 μg/mL, 16.00、16.00、125.00、50.00、50.00 μg/mL) 制备血浆样品作为质控样品。根据美国 FDA 生物分析方法学验证的指导原则, 分别考察上述生物碱的精密度、准确度、回收率、基质效应和稳定性。

2 实验结果

2.1 大鼠慢性心力衰竭模型建立

造模后, 可见慢性心力衰竭大鼠畏寒喜暖、弓背

蜷缩、体毛枯疏、阴囊皱缩、睾丸回升、肛周污染、饮食减少、活动减少、反应迟钝、腹泻、腹水甚至死亡等一般情况^[9]。

2.2 药动学参数

结果, 精密度、准确度考察 RSD 均小于 15%, 回收率在 80% ~ 105% 范围内, 基质效应在 90% ~ 110% 范围内, 稳定性 RSD 均小于 15%, 结果表明, 本研究采用的测定血浆中生物碱浓度的分析方法符合要求。人参皂苷的血药浓度-时间数据采用 Win-Nonlin 6.3 软件分析, 两组间药动学参数应用 SPSS 19.0 统计软件包进行分析。结果见表 1、2, 图 1、2。

表 1 参附注射液对大鼠静脉注射后人参皂苷 Rg₁ 和 Re 的药动学参数 (n = 6, x ± s)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of ginsenoside Rg₁ and Re in rat after intravenous administration of Shenfu Injection (n = 6, x ± s)

参数 Parameters	人参皂苷 Rg ₁ Ginsenoside Rg ₁		人参皂苷 Re Ginsenoside Re	
	正常组 Normal group	模型组 Model group	正常组 Normal group	模型组 Model group
	C _{max} (μg/mL)	6.65 ± 1.17	9.07 ± 1.52 *	5.02 ± 0.97
AUC _{last} (μg · h/mL)	13.90 ± 2.56	20.98 ± 4.06 *	10.29 ± 1.76	15.14 ± 3.10
V _z /F (L/kg)	2354.07 ± 433.56	1349.37 ± 305.69	2916.54 ± 637.83	712.80 ± 187.23 *
Cl/F (L/h · kg)	681.67 ± 170.55	471.41 ± 118.06 *	698.72 ± 160.63	340.37 ± 64.72 *
t _{1/2} (h)	1.38 ± 0.34	1.42 ± 0.60	1.23 ± 0.42	1.32 ± 0.54
T _{max} (h)	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00
MRT _{last} (h)	2.11 ± 1.03	2.59 ± 1.87	2.20 ± 1.61	2.63 ± 1.63

注: 与正常组比较, * P < 0.05。

Note: Compared with the normal group, * P < 0.05.

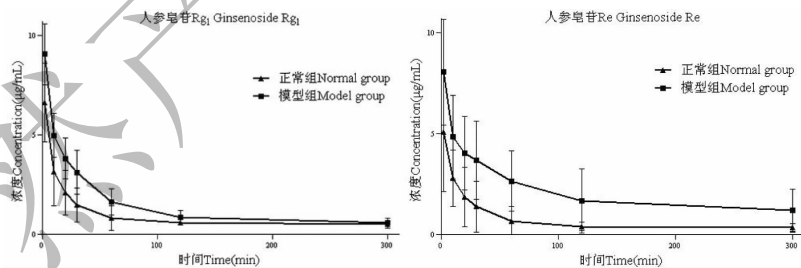


图 1 参附注射液对大鼠静脉注射后人参皂苷 Rg₁ 和 Re 的平均药时曲线 (n = 6)

Fig. 1 Mean plasma concentration-time profiles of ginsenoside Rg₁ and Re in rat after intravenous administration of Shenfu Injection (n = 6)

3 讨论与结论

相关研究报道, 阿霉素可使心肌收缩力下降, 心肌肥厚和舒张功能障碍, 可直接损伤心肌细胞核及线粒体, 产生原发性损伤; 且阿霉素大鼠慢性心力衰竭模型与人的心肌病慢性心力衰竭相似, 模型稳定

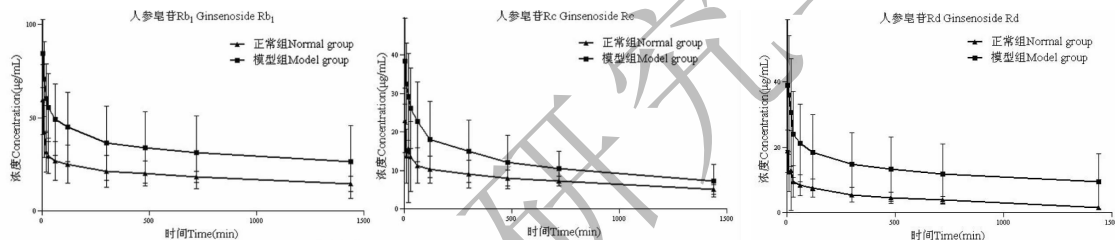
可靠, 可重复性好, 成功率高, 实验动物大鼠经济且来源充足, 具有广泛的应用价值^[10, 11]。所以, 本研究采用阿霉素制备大鼠慢性心力衰竭模型。同时, 作者前期也对盐酸阿霉素的剂量进行了筛选, 最终确定盐酸阿霉素 24 mg/kg 体重复制大鼠慢性心力衰竭模型。

表2 参附注射液对大鼠静脉注射后人参皂苷 Rb₁、Rc 和 Rd 的药学参数 ($n=6, \bar{x} \pm s$)Table 2 Pharmacokinetic parameters of ginsenoside Rb₁, Rc and Rd in rat after intravenous administration of Shenfu Injection ($n=6, \bar{x} \pm s$)

参数 Parameters	人参皂苷 Rb ₁ Ginsenoside Rb ₁		人参皂苷 Rc Ginsenoside Rc		人参皂苷 Rd Ginsenoside Rd	
	正常组 Normal group	模型组 Model group	正常组 Normal group	模型组 Model group	正常组 Normal group	模型组 Model group
C _{max} (μg/mL)	59.61 ± 12.81	84.37 ± 18.08 *	22.98 ± 8.45	38.45 ± 11.15 *	18.77 ± 6.51	38.98 ± 9.97 *
AUC _{last} (μg · h/mL)	481.94 ± 138.82	811.35 ± 143.38 *	165.40 ± 60.06	292.79 ± 110.32 *	99.56 ± 34.00	318.39 ± 129.65 *
V _z /F (L/kg)	232.17 ± 90.43	161.01 ± 62.81	276.59 ± 112.91	193.84 ± 85.74	299.73 ± 153.47	133.89 ± 88.49
Cl/F (L/h · kg)	5.69 ± 1.00	5.08 ± 0.95	19.71 ± 2.49	6.85 ± 0.73 *	13.52 ± 1.64	6.84 ± 0.99 *
t _{1/2} (h)	9.95 ± 1.56	10.63 ± 1.33	8.28 ± 1.13	9.31 ± 0.76	8.67 ± 1.12	9.27 ± 1.34
T _{max} (h)	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00
MRT _{last} (h)	44.87 ± 13.82	60.72 ± 15.95	16.66 ± 7.44	29.19 ± 10.13	14.82 ± 11.27	22.44 ± 9.54

注:与正常组比较, * P < 0.05。

Note: Compared with the normal group, * P < 0.05.

图2 参附注射液对大鼠静脉注射后人参皂苷 Rb₁、Rc 和 Rd 的平均药时曲线 ($n=6$)Fig. 2 Mean plasma concentration-time profiles of ginsenoside Rb₁, Rc and Rd in rat after intravenous administration of Shenfu Injection ($n=6$)

中药复方成分复杂,药效成分不明确,血药浓度低,单体成分的药动学参数难以完整地表达中药复方的体内作用规律^[12]。因此,本研究同时考察了参附注射液中人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁ 等多种人参皂苷成分的药动学特征。采用 WinNonlin 6.3 药动学软件进行自动拟合数据处理,以理论血药质量浓度值与实验测得值相关系数最大和 AIC 最小作为判定标准,确定最佳拟合房室模型,结果表明,五种人参皂苷在体内的药动学过程较符合非房室模型。正常组和模型组大鼠给药后人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁、Rc 和 Rd 的 C_{max} (μg/mL) 分别为 6.65, 9.07; 5.02, 8.06; 59.61, 84.37; 22.98, 38.45; 18.77, 38.98。AUC_{last} (μg · h/mL) 分别为 13.90, 20.98; 10.29, 15.14; 481.94, 811.35; 165.40, 292.79; 99.56, 318.39。Cl/F (L/h · kg) 分别为 681.67, 471.41; 698.72, 340.37; 5.69, 5.08; 19.71, 6.85; 13.52, 6.84。总体而言,正常组与 Li ZG^[13] 的研究结果较

为一致;人参皂苷 Rg₁ 和 Re 在大鼠体内体现为快消除的特征,而人参皂苷 Rb₁、Rc 和 Rd 体现为慢消除的特征,这与相关文献报道的人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁、Rc 和 Rd 的药动学特征大致相符合;且人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁、Rc 和 Rd 不同的药动学特征主要与其结构中所带糖苷的数量和位置不同有关^[14,15]。而分析两组大鼠的药动学参数,发现两组的部分药动学参数存在显著差异。五种人参皂苷的 C_{max}、AUC_{last} 均呈现出模型组大于正常组,提示,与正常大鼠相比,慢性心力衰竭大鼠对药物的吸收量增加,说明模型组大鼠对参附注射液的生物利用度高于正常组大鼠。Cl/F 均呈现出模型组小于正常组,使 C_{max}、AUC_{last} 显著高于正常组,可能是由造模后代代谢酶和组织分布等发生病理变化等原因造成的。同时,t_{1/2}、MRT_{last} 均呈现出模型组长于正常组,提示,与正常大鼠相比,五种人参皂苷在慢性心力衰竭大鼠体内的半衰期和平均滞留时间延长,在大鼠体内

作用时间延长,也促进了其吸收量增加。结果表明,上述五种活性成分在正常和慢性心力衰竭两种状态大鼠体内的药动学过程不同,提示慢性心力衰竭状态会改变药物的体内过程。

综上所述,慢性心力衰竭与正常状态下的大鼠相比较,参附注射液五种人参皂苷活性成分的药动学行为有差异,清除率降低,吸收增加。本研究提示,参附注射液在慢性心力衰竭大鼠体内吸收更好,这也为其临床应用提供一定的实验依据。

参考文献

- 1 Zhang XP (张小沛). Observation of Shengfu injection for chronic heart failure [J]. *China Prac Med* (中国实用医药), 2012, 7(16): 163-164.
- 2 Gu DF (顾东风), Huang GY (黄广勇), He J (何江), et al. Investigation of prevalence and distributing feature of chronic heart failure in Chinese adult population [J]. *Chin J Cardiol* (中华心血管病杂志), 2003, 31(1): 3-6.
- 3 Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics-2010 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2011, 123(4): e18-e209.
- 4 Zannad F, McMurray JJV, Krum H, et al. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms [J]. *New Engl J Med*, 2011, 364(1): 11-21.
- 5 Xu LL (徐丽林), Guan CY (管昌益), Wang ZY (王朝阳), et al. Influence of Shenfu Injection on NT-proBNP and the quality of life of chronic heart failure patients [J]. *J Emerg Tradit Chin Med* (中国中医急诊), 2015, 24: 918-920.
- 6 Li X (李夏), Tang MH (汤明海), Zhang F (张帆), et al. Quantitative determination of ginsenoside Re and RgI in human plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Sichuan Univ: Med Sci* (四川大学学报:医学版), 2009, 40: 912-917.
- 7 Yu H (余洪), Chen XY (陈新宇), Lu Q (卢青), et al. Establishment of chronic heart failure rat model with heart yang deficiency [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm* (中医药导报), 2013, 19(3): 6-8.
- 8 Chen Q (陈奇). Methodology of pharmacological research of TCM (中药药理研究方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996: 408-409.
- 9 Wu SD (吴时达), Xu JB (徐俊波), Fu YZ (付远忠), et al. Study of heart and kidney-yang deficiency rat model in chronic congestive heart failure [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Intens Crit Care* (中国中西医结合急救杂志), 2002, 9: 197-201.
- 10 Li MX (李梅秀), Tian GZ (田国忠), Ou YT (欧叶涛), et al. The establishment of a chronic heart failure model by adrinmycin and the judgement of the indexes [J]. *Anat Res* (解剖学研究), 2005, 27: 176-178.
- 11 Guo YT (郭豫涛), Tan Y (谭毅). Animal model of congestive heart failure [J]. *Shanghai Lab Anim Sci* (上海实验动物科学), 2001, 21: 122-126.
- 12 Yin JJ (殷锦锦), Zhou BJ (周本杰). Progress on pharmacokinetics of compound prescriptions of TCM [J]. *J China Pharm* (中国药房), 2012, 23: 4503-4505.
- 13 Li ZG, Zhang R, Wang XP, et al. Simultaneous determination of seven ginsenosides in rat plasma by highperformance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry: application to pharmacokinetics of Shenfu injection [J]. *Biomed Chromatogr*, 2015, 29: 167-175.
- 14 Kang A (康安), Qian J (钱静), Shan JJ (单进军), et al. *In vivo* pharmacokinetic study on total saponins from roots of *Panax ginseng* in rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2015, 46: 3045-3050.
- 15 Liu H, Yang J, Du F, et al. Absorption and disposition of ginsenosides after oral administration of *Panax notoginseng* extract to rats [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37: 2290.