安宫牛黄丸中11种主要成分含量测定及大鼠体内暴露研究

何阿娜[1], 夏梦贝[1], 彭 英[1], 阿基业[1,2,3*], 王广基[1,2,3]

(1. 中国药科大学, 江苏省药物代谢动力学重点实验室, 江苏 南京 210009; 2. 中国医学科学院“中药复杂组分PK-PD结合研究”创新单元, 江苏 南京 210009; 3. 国家中医药管理局中药复方药物代谢动力学方法重点研究室, 江苏 南京 210009)

摘要: 研究和评价6个安宫牛黄丸 (ANP) 市售产品中11种主要成分的含量和体内暴露水平。建立同时检测脱氧胆酸 (DCA)、胆酸 (CA)、猪去氧胆酸 (HDCA)、甘氨胆酸 (GCA)、牛磺胆酸 (TCA)、姜黄素 (CC)、黄芩苷 (BC)、小檗碱 (BBR)、藏红花酸 (CRT) 的高效液相色谱−质谱联用方法, 建立同时测定麝香酮 (MCN) 和冰片 (BN) 的气相色谱−质谱联用方法。采用上述建立的方法测定11种成分的含量以及大鼠灌胃给予ANP后主要成分在血浆中的暴露水平并进行比较 (本实验所有动物实验均获得中国药科大学动物实验伦理委员会批准, 伦理号: 2024-07-131)。建立了LC-MS/MS和GC-MS分析方法, 应用于测定11种主要成分的含量和体内暴露水平。6个不同ANP产品中, HDCA、DCA、CA、GCA、TCA、CC、BC、CRT、BBR、BN和MCN共11种化合物的含量范围分别为0.22 ± 0.03～1.47 ± 0.41、0.22 ± 0.03～1.48 ± 0.39、0.65 ± 0.01～4.28 ± 0.30、0.44 ± 0.01～0.80 ± 0.02、0.49 ± 0.05～1.36 ± 0.04、0.001 2 ± 0.000 1～0.007 1 ± 0.001 0、3.49 ± 0.80～4.47 ± 0.13、0.003 6 ± 0.001 1～0.013 7 ± 0.014 8、1.77 ± 0.05～4.84 ± 0.41、4.70 ± 2.09～10.91 ± 3.08、0.20 ± 0.03～0.44 ± 0.04 mg·g^{-1}。血浆中暴露水平测定结果表明: HDCA、DCA、CA、GCA、TCA、BC、CRT共7种成分体内血浆暴露范围分别为5 088.63 ± 2 701.16～11 819.10 ± 7 585.61、3 639.42 ± 1 970.63～18 853.46 ± 18 309.75、19 397.89 ± 9 464.21～182 870.72 ± 236 816.06、11 011.97 ± 4 236.99～57 331.79 ± 76 180.09、53 607.57 ± 43 279.12～109 961.78 ± 82 288.37、590.17 ± 175.72～2 424.90 ± 589.22、74.95 ± 19.38～586.84 ± 194.49 h·ng·mL^{-1}, 而其他4种成分的暴露量低而未进行统计。本研究建立了定量检测方法并应用于评估6种商业产品ANP中11种成分的含量和体内暴露水平差异, 发现部分成分在6种ANP市售产品中含量和体内暴露量具有较高可比性, 特别是含有相同天然或人工来源的牛黄、麝香产品, 或者源于同公司ANP产品间差异较小, 其他一些成分差异较大。本研究提示控制中药材来源和质量、规范制剂的加工炮制工艺对产品质量的重要性, 为该产品质量的监管和一致性评价提供了数据和可供借鉴的方法。

关键词: 安宫牛黄丸; 含量; 体内暴露

中图分类号: R917 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)08-2585-10

Quantitative analysis of 11 components in Angong Niuhuang Pills and the assessment of their contents of the products and *in vivo* exposure in rats

HE A-na[1], XIA Meng-bei[1], PENG Ying[1], A Ji-ye[1,2,3*], WANG Guang-ji[1,2,3]

(*1. The Key Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics of Jiangsu Province, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Component PK-PD Combination Research, Innovation Unit of Chinese Academy of Medical Sciences, Nanjing 210009, China; 3. Key Laboratory of Pharmacokinetic Methods of Traditional Chinese Medicine Compounds, National Administration of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210009, China*)

Abstract: This study aimed to quantitatively evaluate the contents and *in vivo* exposure levels of 11 primary

收稿日期: 2025-02-25; 修回日期: 2025-05-28.
基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目资助 (2021-I2M-5-011).
*通讯作者 E-mail: jiyea@cpu.edu.cn
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0194

components in six commercially available Angong Niuhuang Pill (ANP) products. A chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed for the simultaneous quantification of deoxycholic acid (DCA), cholic acid (CA), hyodeoxycholic acid (HDCA), glycocholic acid (GCA), taurocholic acid (TCA), curcumin (CC), baicalin (BC), berberine (BBR), and crocetin (CRT). A gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method was established to determine muscone (MCN) and borneol (BN). The analytical methods were validated and applied to assess the content of the 11 components in six ANP products and their plasma exposure levels following intragastric administration in rats (All animal experiments had been approved by the Experimental Animal Ethics Committee of China Pharmaceutical University, ethics number: 2024-07-131). The quantitative methods utilizing LC-MS/MS and GC-MS were successfully established and validated for the simultaneous quantification of DCA, CA, HDCA, GCA, TCA, CC, BC, BBR, CRT, MCN and BN both *in vivo* and *in vitro* samples, respectively. The contents of HDCA, DCA, CA, GCA, TCA, CC, BC, CRT, BBR, BN and MCN varied over the ranges between 0.22 ± 0.03−1.47 ± 0.41, 0.22 ± 0.03−1.48 ± 0.39, 0.65 ± 0.01−4.28 ± 0.30, 0.44 ± 0.01−0.80 ± 0.02, 0.49 ± 0.05−1.36 ± 0.04, 0.001 2 ± 0.000 1−0.007 1 ± 0.001 0, 3.49 ± 0.80−4.47 ± 0.13, 0.003 6 ± 0.001 1−0.013 7 ± 0.014 8, 1.77 ± 0.05−4.84 ± 0.41, 4.70 ± 2.09−10.91 ± 3.08, 0.20 ± 0.03−0.44 ± 0.04 mg·g^{-1}, respectively. Similarly, the *in vivo* plasma exposure of HDCA, DCA, CA, GCA, TCA, BC, CRT covered the ranges over 5 088.63 ± 2 701.16−11 819.10 ± 7 585.61, 3 639.42 ± 1 970.63−18 853.46 ± 18 309.75, 19 397.89 ± 9 464.21−182 870.72 ± 236 816.06, 11 011.97 ± 4 236.99−57 331.79 ± 76 180.09, 53 607.57 ± 43 279.12−109 961.78 ± 82 288.37, 590.17 ± 175.72−2 424.90 ± 589.22, 74.95 ± 19.38−586.84 ± 194.49 h·ng·mL^{-1}, respectively. The plasma concentrations of the other four components (CC, BBR, BN, MCN) were below the detection limit. Three robust quantitative analytical methods were established and applied to evaluate variations of the content and *in vivo* exposure levels of 11 components in six ANP commercial products. The results demonstrated that the contents and *in vivo* exposure of some of the 11 components are consistent in the 6 products, particularly in the products containing the same natural or artificial bezoar and musk, or those manufactured by the same company. However, the inconsistency of the contents and *in vivo* exposure of some other ingredients suggests variations in the selection of raw herb medicines or processing technology. It suggests the crucial importance to monitor the source and quality of the raw herb medicines, and unify the processing technology. Furthermore, this study provides the data and reference methods for the supervision and consistency evaluation of quality amongst the products.

Key words: Angong Niuhuang Pill; content; *in vivo* exposure

脑卒中是一种由于脑血管突然破裂或梗塞, 导致脑组织损伤的急性脑血管疾病, 目前全球死亡人数逐渐增加, 其特点是突发性神经功能损伤, 其中缺血性脑卒中 (IS) 约占所有病例的85%。目前, 临床上常用治疗方案是使用组织纤溶酶原激活剂进行溶栓或血栓切除术, 这是FDA唯一批准的缺血性脑卒中临床治疗方法, 具有一定的不良反应[1]。安宫牛黄丸 (Angong Niuhuang Pill, ANP) 作为一味中国传统中药, 已被中国国家食品药品监督管理局批准用于治疗急性脑卒中, 对缺血性脑卒中具有确切疗效[2-4]。ANP由多种中草药组成, 包括牛黄、水牛角浓缩粉、麝香、珍珠、朱砂、雄黄、黄连、黄芩、栀子、郁金、冰片等11味药材。据记载, ANP中许多成分具有与脑卒中相关的药理作用。例如, 姜黄素 (CC) 通过减少氧化应激缓解神经元损伤[5], 或者抑制NF-κB、NLRP3信号通路[6], 减少脑卒中导致的损伤; 牛黄中的猪去氧胆酸 (HDCA)[7]、脱氧胆酸 (DCA)[8]、胆酸 (CA)[9]是缺血性脑卒中的潜在有效成分; 黄芩苷 (BC) 可以减少BMECs细胞的凋亡, 保护紧密连接, 抵抗免疫细胞浸润, 从而缓解缺血性脑卒中[10], 或者通过阻止铁死亡的进展, 防止脑卒中的发展[11]; 藏红花酸 (CRT) 可以通过促进Nrf2核转位减轻脑出血诱导的神经元铁死亡[12], 从而缓解脑卒中的进展; 小檗碱 (BBR) 通过降低细胞内ROS水平预防缺血性脑损伤[13]; 麝香酮 (MCN) 通过激活缺血性脑卒中后的PPAR-γ信号通路增强小胶质细胞向M2表型的转化[14], 使其成为治疗缺血性脑卒中的候选药物; 而冰片 (BN) 促进纹状体和脑室下区域的神经发生和血液循环, 对恢复期脑缺血具有神经保护作用[15]。

中药复方制剂因药材来源[16]、产地[17]及炮制工艺[18]等因素导致其化学成分各异, 加之不同生产厂家的原料选用和生产过程也存在不同, 使得各产品质量参差不齐。单纯的考虑中药复方制剂中的单一成分含量多寡难以很好控制产品质量, 例如, Xie等[19]建立了在同一波长下同时对葛根芩连汤中9个主要成分的含量进行测定; Tian等[20]通过建立超高效液相色谱−串联质谱检测方法, 对金芪降糖胶囊进行多成分含量研究;

Li等[21]建立LC-MS检测方法, 用以测定大鼠灌胃黄芩汤后血浆中黄酮类和萜类成分, 并研究在大鼠体内的药代动力学特征。目前市场上多个厂家生产的ANP制剂虽广泛应用, 但目前尚无规范的国家标准和系统的质量评价体系, 尤其缺乏对不同厂家产品中多组分含量及用药后体内暴露水平的同步对比研究。为此, 本研究拟联合采用LC-MS/MS和GC-MS技术, 对不同市售ANP产品进行多指标成分定量分析及体内暴露程度比较, 为建立科学的质量控制标准提供参考。

材料与方法

仪器 AB Sciex 5500+三重四级杆质谱仪、Exion LC二元泵、ExionLC自动进样器和ExionLC柱温箱 (AB SCIEX, 美国); Milli-Q Gradient A10超纯水机 (Millipore, 德国); Sovall Biofuge Stratos低温高速离心机 (Thermo Fisher Scientific, 美国); GCMS-QP2010和AOC-20i自动进样器 (Shimadzu, 日本)。

标准品与试剂

标准品 HDCA (批号: SLBT0990)、DCA (批号: SLBB6491V)、CA (批号: SLBV8654)、GCA (批号: SLBZ5314)、TCA (批号: SLBX2412)、去氢胆酸 (DHCA, 批号: BCBZ5938, 以上标准品纯度均 ≥ 98%)、*DL*-4-氯苯丙氨酸 (Cl-Phe, 批号: SHBL0057, 纯度 ≥ 98%)、CC (批号: WXBD8639V, 纯度95%)、肉豆蔻酸甲酯 (MEMY, 批号: BCCN1240, 纯度 ≥ 98%) 和BC (批号: MKCR0641, 纯度95%) 均购买自美国Sigma公司; BBR (批号: 242354, 纯度 ≥ 99%) 和BN (批号: S395901, 纯度 ≥ 97%) 购买自美国MCE公司; CRT (批号: MUST-22033010, 纯度 ≥ 98%) 与MCN (批号: MUST-16051006, 纯度98%) 由成都曼思特生物科技有限公司。

试剂 *N*-甲基-*D*-葡糖胺 (批号: Y27A10C87050, 纯度 ≥ 98%) 购自上海源叶生物科技有限公司; 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na, 批号: F2310077, 纯度 ≥ 99%)、肝素钠 (批号: A2314127, 180 USP units/mg) 和甲酸 (批号: F2427324, 色谱级) 购买自Aladdin公司; 无水乙醇 (批号: P3331728, 纯度 ≥ 99.7%) 购自上海泰坦科技股份有限公司; 乙酸乙酯 (批号: 20210827, 色谱级) 购自永华化学股份有限公司; 二甲基亚砜 (DMSO, 批号: 3231026003, 纯度 ≥ 99%) 购自索莱宝科技有限公司; 甲醇和乙腈 (色谱级) 购买自德国Merck公司; 实验用水由超纯水机 (Milli-Q Gradient A10) 制备。

药物 来自不同制造商的6种ANP产品 (ANP001～ANP006), 所使用牛黄与麝香两种草药分别为: 产品ANP-001和ANP-002, 天然牛黄+天然麝香; 产品ANP-003和ANP004, 天然牛黄+人工麝香; 产品ANP-005和ANP-006, 人工牛黄+人工麝香。

主要溶液配制

储备液配制 分别精密称取HDCA、DCA、CA、GCA、TCA、BN、MCN、DHCA、MEMY和Cl-Phe各10 mg, 转移至10 mL量瓶中, 用甲醇定容至刻度线, 充分颠倒将其混匀, 配制成终浓度为1 mg·mL^{-1}的储备液; 分别精密称取CC、BC、CRT和BBR各10 mg, 转移至10 mL量瓶中, 用DMSO定容至刻度线, 充分颠倒将其混匀, 配制成终浓度为1 mg·mL^{-1}的储备液, 保存在−20 ℃。

混合工作液配制 取HDCA、DCA、CA、GCA和TCA储备液, 用甲醇稀释为系列浓度的混合工作液, 浓度分别为100、200、500、1 000、2 000、5 000、10 000 ng·mL^{-1}, 同上述方法分别配制CC、BC、CRT和BBR的混和工作液, 浓度分别为10、20、50、100、200、500、1 000、2 000、5 000、10 000 ng·mL^{-1}; 以及BN和MCN的混合工作液, 浓度分别为500、1 000、2 000、5 000、10 000、20 000、50 000、100 000 ng·mL^{-1}, 混合工作液现用现配。

QC工作液配制 取HDCA、DCA、CA、GCA和TCA储备液, 用甲醇稀释为系列浓度的混合工作液, 浓度分别为30、100、800 ng·mL^{-1}; 同上述方法分别配制CC、BC、CRT和BBR的混和工作液, 浓度分别为3、100、400、800 ng·mL^{-1}; BN和MCN的混合工作液, 浓度分别为150、600、2 000、8 000 ng·mL^{-1}; 混合工作液现用现配。

内标溶液配制 取1 mg·mL^{-1} DHCA与1 mg·mL^{-1} Cl-Phe储备液, 配制成含200 ng·mL^{-1} DHCA与200 ng·mL^{-1} Cl-Phe的甲醇沉淀剂; 取1 mg·mL^{-1} MEMY储备液, 配制成含1 000 ng·mL^{-1} MEMY的乙酸乙酯萃取液。

给药溶液配制 称取一定量ANP于研钵中, 加入适量混合溶剂 (0.5% CMC-Na∶5% *N*-甲基-*D*-葡萄糖胺∶乙醇 = 3∶2∶2), 充分研磨, 配制成0.1 g·mL^{-1}混悬液。

液相色谱和质谱检测条件

色谱条件 安捷伦ZORBAX Eclipse Plus C18色谱柱 (4.6 mm × 50 mm, 3.5 μm), 流动相: 0.05%甲酸 (A)−乙腈 (B), 梯度洗脱: 方法1用于测定HDCA、DCA、CA、GCA和TCA: 0～1 min (10% B)、1～1.5 min (10%～35% B)、1.5～7.5 min (35%～55% B)、7.5～8 min (55%～85% B)、8～11 min (85% B)、11～11.5 min (85%～10% B)、11.5～14 min (10%), 流速: 0.6 mL·min^{-1}, 内标为DHCA; 方法2用于测定CC、BC、BBR和CRT, 洗脱梯度: 0～1 min (10% B), 1～3.2 min (10%～30% B), 3.2～

5 min (30%～85% B), 5～8 min (85% B), 8～9 min (85%～10% B), 9～11 min (10%), 流度: 0.5 mL·min^{-1}, 内标为Cl-Phe; 进样体积: 5 μL。

质谱条件　电喷雾离子源 (ESI); 条件优化如下: HDCA、DCA、CA、GCA和TCA: 负离子检测模式; 辅助气体1 (ion source gas 1, GS 1, N_2), 65 Arb; 辅助气体2 (GS 2, N_2), 70 Arb; 辅助气温度 (temperature, TEM), 550 ℃; 气帘气 (curtain gas, CUR), 35 Arb; 碰撞气 (collision gas, CAD, N_2), medium; CC、BC、CRT和BBR: 正负离子同时检测; 辅助气体1 (N_2), 65 Arb; 辅助气体2 (N_2), 70 Arb; 辅助气温度, 550 °C; 气帘气, 35Arb; 碰撞气 (N_2), medium。目标化合物的检测参数如表1所示。

Table 1　MRM parameters of the analytes. HDCA: Hyodeoxycholic acid; DCA: Deoxycholic acid; CA: Cholic acid; GCA: Glycocholic acid; TCA: Taurocholic acid; CC: Curcumin; BC: Baicalin; BBR: Berberine; CRT: Crocetin; MCN: Muscone; BN: Borneol; Cl-Phe: 4-Chloro-*DL*-phenylalanine; POS: Positive detection mode; NEG: Negative detection mode; MEMY: Methyl myristate; DHCA: Dehydrocholic acid; IS: Internal standard

Analyte	Mode	Q1/Da	Q3/Da	DP/V	CE/eV
HDCA	−	391.3	391.3	−40	−5
DCA	−	391.4	345.4	−40	−45
CA	−	407.3	343.2	−40	−48
GCA	−	464.4	74.1	−40	−67
TCA	−	514.4	124.1	−40	−83
CC	−	367.2	217.1	−60	−15
BC	−	445.1	269.1	−100	−36
CRT	−	327.2	283.3	−40	−13
BBR	+	336.2	292.2	120	39
DHCA (IS)	−	401.4	401.4	−100	−10
Cl-Phe-NEG (IS)	−	198.0	181.0	−90	−18
Cl-Phe-POS (IS)	+	200.0	154.0	40	16

气相色谱和质谱检测条件

色谱条件　岛津SH-Rxi-5Sil-MS (30.0 m × 0.25 μm × 0.25 mm) 色谱柱; 程序升温: 0～2 min (80 ℃)、2～5 min (80～200 ℃)、5～7 min (200 ℃)、7～9.5 min (200～300 ℃)、9.5～12.5 min (300 ℃); 进样体积: 2 μL。

质谱条件　电喷雾离子源; 条件优化如下: 载气: 氦气; 总流速: 19.4 mL·min^{-1}; 色谱柱流速: 1.23 mL·min^{-1}; 分流比: 10∶1; 进样口温度: 210 ℃; 离子源温度: 220 ℃; 传输管温度: 220 ℃; 检测器电压: 0.96 kV。扫描模式: 选择离子模式 (SIM), BN: 95 Da (*m*/*z*), MCN: 238 Da (*m*/*z*), MEMY (内标): 143 Da (*m*/*z*)。色谱保留时间分别为4.5、8.2、7.2 min。

样品制备

含量测定样品　平行称取60 mg样品各3份 (*n* = 3), 加入1.8 mL超纯水或DMSO, 100 Hz超声30 min促进溶解, 得到混悬液。适当稀释后, 取50 μL混悬液, 加入150 μL甲醇 (含200 ng·mL^{-1} DHCA和200 ng·mL^{-1} Cl-Phe), 振荡 (1 800 r·min^{-1}, 5 min), 离心 (18 000 r·min^{-1}, 5 min) 后, 取120 μL上清液, 再次离心 (18 000 r·min^{-1}, 5 min), 取80 μL上清液进行LC-MS/MS分析。取上述混悬液进行适当稀释, 取稀释后混悬液300 μL, 加入300 μL乙酸乙酯 (含1 μg·mL^{-1} MEMY), 萃取 (1 800 r·min^{-1}, 5 min), 离心 (8 000 r·min^{-1}, 5 min) 后, 取200 μL上清液, 再次离心 (18 000 r·min^{-1}, 5 min), 取140 μL上清液进行GC-MS分析。

血浆样品　取50 μL血浆样品, 加入150 μL甲醇 (含200 ng·mL^{-1} DHCA和200 ng·mL^{-1} Cl-Phe), 振荡 (1 800 r·min^{-1}, 5 min), 离心 (18 000 r·min^{-1}, 5 min) 后, 取120 μL上清液, 再次离心 (18 000 r·min^{-1}, 5 min), 取80 μL上清液进行LC-MS/MS分析。取50 μL血浆样品, 加入150 μL乙酸乙酯 (含1 μg·mL^{-1} MEMY), 萃取 (1 800 r·min^{-1}, 5 min), 离心 (8 000 r·min^{-1}, 5 min) 后, 取120 μL上清液, 再次离心 (18 000 r·min^{-1}, 5 min), 取80 μL上清液进行GC-MS分析。

吸附后血浆制备　取SD大鼠空白血浆, 按照血浆∶活性炭 (*V*∶*m*) = 5∶1进行振荡吸附 (1 800 r·min^{-1}, 10 h), 离心 (8 000 r·min^{-1}, 10 min) 后取上清, 进行二次离心 (8 000 r·min^{-1}, 10 min), 上清液即为吸附后空白血浆。

方法学验证

标准曲线　取吸附后空白SD大鼠血浆45μL, 加入HDCA、DCA、CA、GCA和TCA混合工作液5 μL, 充分混匀后配制成浓度为10、20、50、100、200、500、1 000 ng·mL^{-1}的血浆样品, 按照“样品制备”项下“血浆样品”方法处理后进行LC-MS/MS和GC-MS分析。取空白SD大鼠血浆45 μL, 加入CC、BC、BBR和CRT混合工作液5 μL, 或BN和MCN混合工作液5 μL, 充分混匀后配制成浓度为1、2、5、10、20、50、100、200、500、1 000 ng·mL^{-1}或50、100、200、500、1 000、2 000、5 000、10 000 ng·mL^{-1}的血浆样品, 按照“样品制备”项下“血浆样品”方法处理后进行LC-MS/MS和GC-MS分析。以分析物的峰面积与内标峰面积之比为*y*值, 以理论浓度为*x*值, 进行回归运算 (权重系数, *w*:1/*x*), 得到所有分析化合物在生物样品中的线性回归方程。

专属性　取空白血浆、加标样品以及灌胃给予ANP后血浆样品, 分别按照“样品制备”项下“血浆样品”方法处理, 进行LC-MS/MS和GC-MS分析, 得到典型色谱图。空白血浆中11种化合物的响应小于应加标样品的20%。

精密度与准确度　分别在同一天和连续3天对定量下限 (LLOQ)、低浓度对照 (LQC)、中浓度对照 (MQC) 和高浓度对照 (HQC) 样品进行分析来评估精密度和准确度。每批平行制备5个样品, 根据每个批次的标准曲线计算其浓度。精密度用相对标准偏差 (RSD) 表示, 准确度用相对误差 (RE) 表示。LQC、MQC和HQC的RSD和RE应在 ± 15% 以内, LLOQ的RSD和RE在 ± 20% 以内。

基质效应和提取回收率　通过将LQC、MQC和HQC浓度下, 提取后加标样品的峰面积与相同浓度的水溶液的峰面积进行比较来评估基质效应; 通过比较常规提取样品的峰面积与提取后加标样品的峰面积来评估提取回收率。各组每个浓度下均平行制备5份样品。提取回收率应在85%～115%之间, RSD在15%以内。

样品稳定性　通过分析LQC、MQC和HQC样品验证稳定性, 每个浓度水平的样品平行制备5份, 进行不同处理: 样品处理前在室温下放置6 h; 在−80 ℃下储存3天; −80 ℃冷冻后在室温解冻循环3次, 样品按照“样品制备”项下“血浆样品”方法进行前处理后进样。另一组样品按照“样品制备”项下“血浆样品”方法预先进行样品前处理后, 在自动进样器中放置24 h。根据当日随行标准曲线回算样品中各分析物的实测浓度。当RE与RSD在 ± 15% 以内时, 则认为该待测物稳定。

稀释效应　使用活性炭吸附后的空白血浆稀释浓度高于定量上限 (ULOQ) 的血浆样品以评估血浆中5种胆汁酸 (HDCA、DCA、CA、GCA和TCA) 的稀释效应。RE和RSD应在 ± 15% 以内。

大鼠口服ANP后的药代动力学研究

SD大鼠 (雄性, 6周龄, 190～210 g; 雌性, 7周龄, 190～210 g) 购自浙江维通利华有限公司, 合格证号: 20250331Aazz06190000475。实验开始前, 将动物饲养在室温为22 ± 2 ℃、湿度为55% ± 5% 的环境中1周, 以适应实验室条件。动物福利和实验程序严格按照中国药科大学动物实验指南进行, 并经动物伦理委员会批准 (伦理号: 2024-07-131)。每组取6只SD大鼠 (雌雄各半), 连续6天灌胃给予ANP混悬液, 给药剂量为1 g·kg^{-1}。末次给药前, 大鼠禁食不禁水12 h, 于末次给药后2、5、10和20 min, 以及4、6、8、12和24 h从大鼠眼眶静脉采集200 μL血样 (肝素钠抗凝), 离心 (8 000 r·min^{-1}, 10 min) 后−80 ℃保存。

数据分析

体内暴露水平差异分析　采用Phoenix WinNonlin 6.1 (Phoenix 64, Build 6.4.0.768) 中的非房室模型 (noncompartment analysis, NCA), 分别拟合11种化合物经连续6天灌胃给药后在SD大鼠体内的血浆暴露量 ($AUC_{0-24\,h}$)。

雌雄动物性别差异分析　采用GraphPad Prism (GraphPad 64, Build 8.0.2.263) 中的Two Way ANOVA (two way analysis of variance) 对11种化合物经连续6天灌胃给药后在SD大鼠体内的血浆暴露量进行雌雄差异分析。

变量主成分分析 (principal component analysis, PCA)　为评估6种ANP产品间差异, 将11个主要成分的含量和体内暴露量 ($AUC_{0-24\,h}$), 按照下列方程式进行权重转换, 根据权重后数据利用SIMCA (SIMCA 14.1, MKS Umetrics AB, CA) 进行多变量主成分分析。权重后数据=含量/3+SQRT ($AUC_{0-24\,h}$) /10。

结果

1　方法学验证

本研究采用液相质谱测定9个物质成分, 其结构、性质各异。综合考虑各成分的极性、色谱保留特性、色谱柱、流动性条件、测定灵敏度、检测工作量等, 通过反复多次试验和优化, 最终确定建立两个液相检测方法, 分别对5个胆汁酸成分和CC、BC、BBR、CRT 4个成分进行检测。其中使用C18反相色谱柱, 对5种胆汁酸成分进行分析, 为了取得更好的分离效果, 该方法梯度洗脱1.5～7.5 min内将有机相比例缓慢提升: 1～1.5 min (10%～35% B); 1.5～7.5 min (35%～55% B); 7.5～8 min (55%～85% B)。同样使用C18反相色谱柱, 对CC、BC、BBR、CRT等4种化合物进行检测。其有机相比例以较快速度升高: 1～3.2 min (10%～30% B); 3.2～5 min (30%～85% B); 5～8 min (85% B)。结果证明, 如果采用测定胆汁酸流动相梯度洗脱方法检测CC、BC、BBR和CRT四种化合物, 每个样品分析时间需要大幅延长到30 min; 反之, 若采用测定后面四种物质流动相梯度洗脱方法检测5种胆汁酸成分, 分离效果不佳。

1.1　标准曲线　11种化合物在整个线性范围内具有良好的线性, 相关系数 (R^2) 在0.998 7～0.999 5之间, HDCA、DCA、CA、TCA、GCA线性范围为10～1 000 ng·mL^{-1}, CC、CRT、BBR线性范围为1～500 ng·mL^{-1}, BC线性范围为1～1 000 ng·mL^{-1}, BN的线性范围为50～10 000 ng·mL^{-1}, MCN的线性范围为200～10 000 ng·mL^{-1}。各化合物标准曲线线性方程及相关系数详见表2。

1.2　专属性　11种待测物中, BC、CC、BBR、CRT、BN、MCN和IS在保留时间处没有内源性物质干扰, 且待测物之间以及待测物与内标之间不存在交叉干扰。

Table 2 Linearity of the 11 analytes

Analyte	Range /ng·mL^{-1}	Calibration curve	R^2
HDCA	10−1 000	$Y = 0.001\ 52x - 0.001\ 22$	0.998 9
DCA	10−1 000	$Y = 0.000\ 299x - 0.000\ 338$	0.999 1
CA	10−1 000	$Y = 0.000\ 388x - 0.001\ 25$	0.999 5
GCA	10−1 000	$Y = 0.001\ 01x - 0.001\ 5$	0.999 5
TCA	10−1 000	$Y = 0.001\ 18x - 0.002\ 02$	0.999 0
CC	1−500	$Y = 0.007\ 5x + 0.004\ 1$	0.999 1
BC	1−1 000	$Y = 0.004\ 24x + 0.000\ 982$	0.999 2
CRT	1−500	$Y = 0.000\ 763x + 0.000\ 748$	0.999 0
BBR	1−500	$Y = 0.08x + 0.004\ 78$	0.999 3
BN	50−10 000	$Y = 0.000\ 451\ 5x + 0.011\ 76$	0.999 0
MCN	200−10 000	$Y = 0.000\ 009\ 362x + 0.000\ 787\ 9$	0.998 7

5种胆汁酸作为内源性成分, 在空白血浆中具有一定信号, 经活性炭吸附后, 可以较好地消除空白血浆中内源性成分产生的信号, 具有良好的特异性 (图1)。

1.3 精密度与准确度 精密度与准确度结果表明, LLOQ、LQC、MQC和HQC水平的RSD和RE均在±15%以内, 说明各待测物的精密度、准确度均在可接受范围内。

1.4 基质效应与提取回收率 评估了血浆中11种成分的基质效应和提取回收率, 未观察到明显的基质效应, 同时, 所有化合物的回收率在89.6%～114.2%之间 (表3)。

1.5 稳定性 评估了大鼠血浆中11化合物在各种储存条件下的稳定性, 包括室温稳定性、短期冻存稳定性、冻融稳定性与自动进样盘稳定性。经过统计分析, 所有RE (%) 和RSD (%) 都在±15%以内, 表明所有分析物在典型的样品储存和处理条件下都是稳定的。

1.6 稀释效应 5种胆汁酸稀释样品的RSD和RE均在±15%以内, 表明超过ULOQ的血浆样品经活性炭吸附后血浆进行适当稀释时, 可以可靠地分析样品中胆汁酸的浓度。

2 含量测定

6个不同产品中, HDCA、DCA、CA、GCA、TCA、CC、BC、CRT、BBR、BN和MCN等11种化合物的含量范围分别是0.22 ± 0.03～1.47 ± 0.41、0.22 ± 0.03～1.48 ± 0.39、0.65 ± 0.01～4.28 ± 0.30、0.44 ± 0.01～0.80 ± 0.02、0.49 ± 0.05～1.36 ± 0.04、0.001 2 ± 0.000 1～0.007 1 ± 0.001 0、3.49 ± 0.80～4.47 ± 0.13、0.003 6 ± 0.001 1～0.013 7 ± 0.014 8、1.77 ± 0.05～4.84 ± 0.41、4.70 ± 2.09～10.91 ± 3.08、0.20 ± 0.03～0.44 ± 0.04 mg·g^{-1} (表4)。数据显示, 6个不同厂家间11种化合物的含量有所差异, 其中HDCA的差异最大, 在6个产品中, 含量最高产品是含量最低产品的6.7倍, 黄芩苷的含量则相对接近。组成成分相同的ANP产品间, 11种化合物的差异较小, 含量最高产品与含量最低产品的比值小于4。

Table 3 Matrix effects and extraction recovery all analytes in plasma (n = 5)

Analyte	Spiked /ng·mL^{-1}	Extraction recovery/%	Matrix effect/%
HDCA	20	105.2%	99.2%
	200	96.0%	103.5%
	1 000	98.3%	101.2%
DCA	20	101.7%	95.4%
	200	94.7%	99.9%
	1 000	95.5%	100.9%
CA	20	102.7%	104.1%
	200	98.1%	96.0%
	1 000	98.3%	101.3%
GCA	20	106.1%	104.3%
	200	93.9%	95.1%
	1 000	97.4%	99.2%
TCA	20	110.7%	99.2%
	200	99.4%	102.9%
	1 000	96.5%	99.4%
CC	2	106.8%	105.2%
	200	96.3%	101.9%
	500	92.2%	92.3%
BC	2	103.8%	87.2%
	200	98.6%	86.2%
	1 000	94.0%	92.7%
CRT	2	102.2%	103.9%
	200	97.1%	113.0%
	500	98.9%	107.7%
BBR	2	101.2%	94.7%
	200	100.1%	92.9%
	500	102.8%	88.6%
BN	150	114.2%	108.5%
	2 000	95.3%	97.5%
	8 000	109.3%	101.2%
MCN	600	96.4%	107.9%
	2 000	93.0%	101.6%
	8 000	89.6%	85.3%

3 药代动力学研究

不同产品的体内药代动力学研究中发现, 产品ANP-002中HDCA、DCA、GCA与产品ANP-001中CA与CRT体内暴露量出现较为明显的雌雄差异 (图2), 其他各产品、各成分均未见明显差异。在不同产品中, HDCA、DCA、CA、GCA、TCA、BC和CRT等7种成分体内血浆暴露量范围分别为5 088.63 ± 2 701.16～11 819.10 ± 7 585.61、3 639.42 ± 1 970.63～18 853.46 ± 18 309.75、19 397.89 ± 9 464.21～182 870.72 ± 236 816.06、11 011.97 ± 4 236.99～57 331.79 ± 76 180.09、53 607.57 ± 43 279.12～109 961.78 ± 82 288.37、590.17 ± 175.72～2 424.90 ± 589.22、74.95 ± 19.38～586.84 ± 194.49 h·ng·mL^{-1}, 而CC、BBR、BN和MCN在血浆中未检测到有效浓度。在体内实验中, TCA、CA和GCA的血浆暴露量最高, 6种产品间CA的差异最

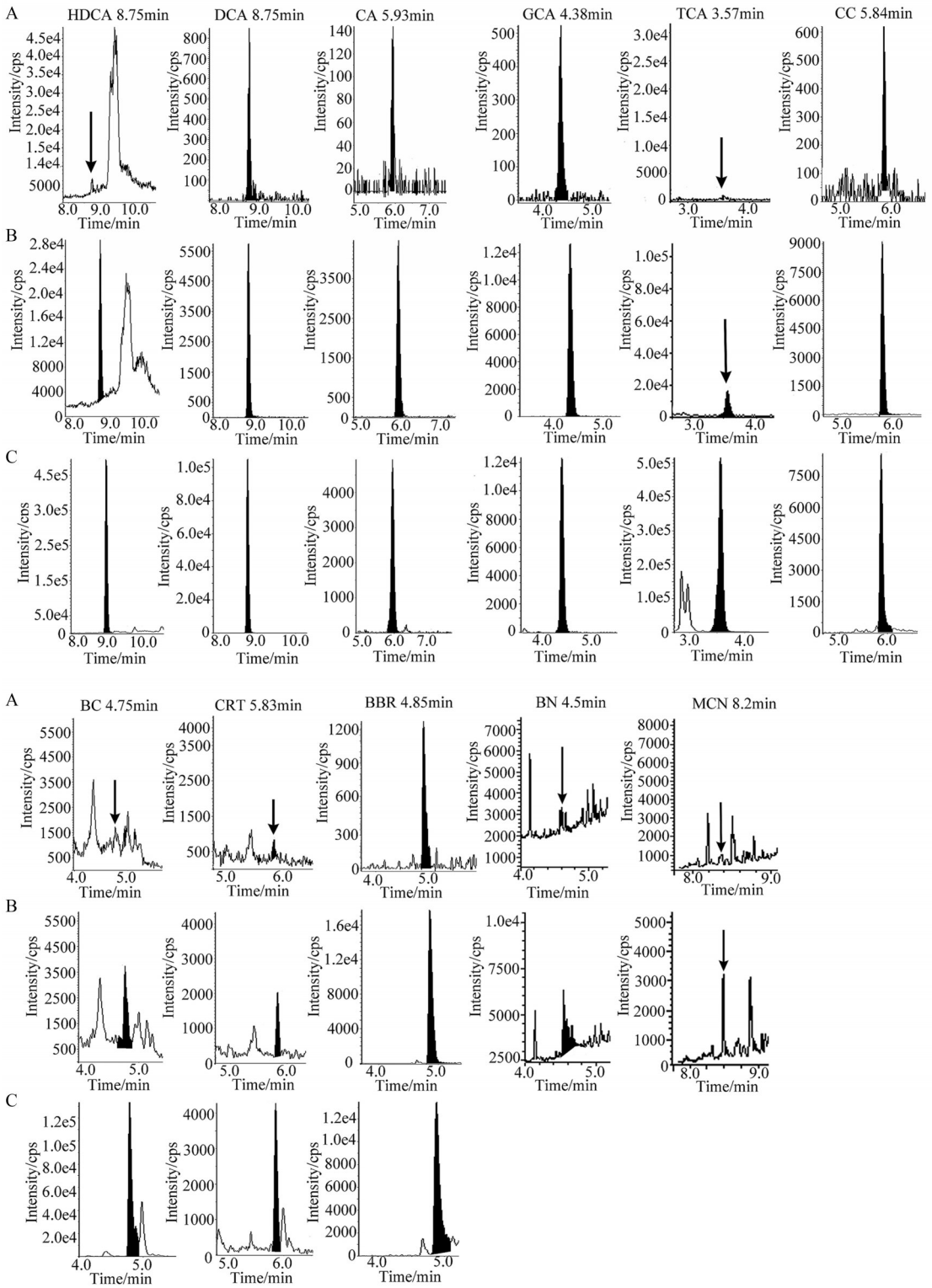


Figure 1 The LC-MS/MS and GC-MS chromatograms of the 11 analytes. A: Blank plasma; B: Spiked with the LLOQ (lower limit of quantification) in plasma; C: Plasma samples (MCN and BN were not detected in plasma samples)

大, 最高者是最低者的9.4倍。

4 PCA分析

综合含量和体内暴露数据, 经PCA分析发现, 不同制造商生产的产品相似度较高, 个别产品与其他品种差异较大 (图3)。根据产品在PCA图中的聚类, 产品ANP-003～006相互靠近, 提示产品质量具有较高的相似性。其中, 均采用天然来源牛黄和人工麝香的产品ANP-003和ANP-004彼此紧密靠近, 提示两者质

Table 4 The contents of 11 compounds of 6 products (mg·g^{-1}). ANP: Angong Niuhuang Pill; ANP-001−ANP-006: ANP products from different companies. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

Analyte/mg·g^{-1}	ANP-001	ANP-002	ANP-003	ANP-004	ANP-005	ANP-006
HDCA	0.22 ± 0.03	0.86 ± 0.06	0.50 ± 0.03	0.39 ± 0.15	0.88 ± 0.05	1.47 ± 0.41
DCA	0.22 ± 0.03	0.86 ± 0.06	0.51 ± 0.02	0.39 ± 0.16	0.89 ± 0.05	1.48 ± 0.39
CA	0.65 ± 0.01	2.35 ± 0.06	1.32 ± 0.06	0.92 ± 0.10	3.57 ± 0.15	4.28 ± 0.30
GCA	0.80 ± 0.02	0.44 ± 0.01	0.66 ± 0.09	0.47 ± 0.04	0.61 ± 0.02	0.64 ± 0.02
TCA	0.67 ± 0.01	0.59 ± 0.01	0.78 ± 0.28	0.49 ± 0.05	1.36 ± 0.04	1.08 ± 0.01
CC	0.007 1 ± 0.001 0	0.005 3 ± 0.001 6	0.001 3 ± 0.000 1	0.003 0 ± 0.000 7	0.001 2 ± 0.000 1	0.003 3 ± 0.009 4
BC	4.38 ± 0.22	4.13 ± 0.05	3.91 ± 0.40	3.80 ± 0.53	3.49 ± 0.8	4.47 ± 0.13
CRT	0.006 0 ± 0.001 3	0.013 7 ± 0.014 8	0.003 6 ± 0.000 6	/	0.006 8 ± 0.001 3	0.003 6 ± 0.001 1
BBR	1.77 ± 0.05	3.87 ± 0.44	1.67 ± 0.12	2.01 ± 0.13	1.93 ± 0.23	4.84 ± 0.41
BN	10.91 ± 3.08	7.44 ± 0.90	4.70 ± 2.09	7.20 ± 1.24	6.30 ± 1.08	7.81 ± 1.29
MCN	0.20 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.44 ± 0.04	0.28 ± 0.01	0.37 ± 0.09	0.39 ± 0.08

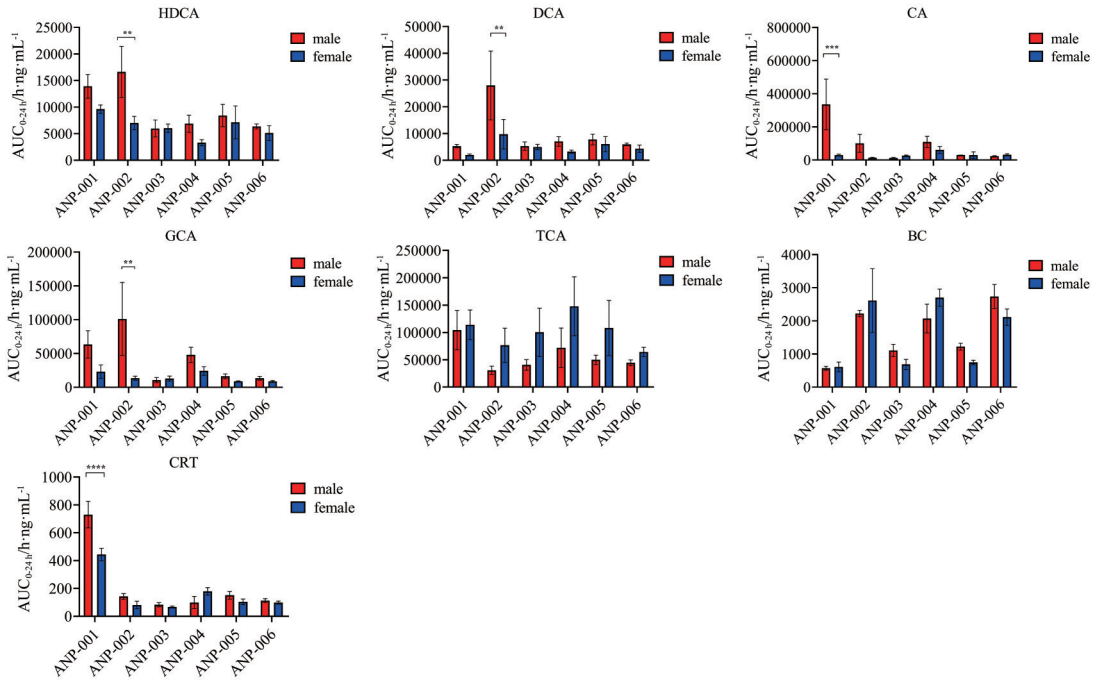


Figure 2 Sex-specific analysis of *in vivo* exposure of seven components in the 6 products in SD rats. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$

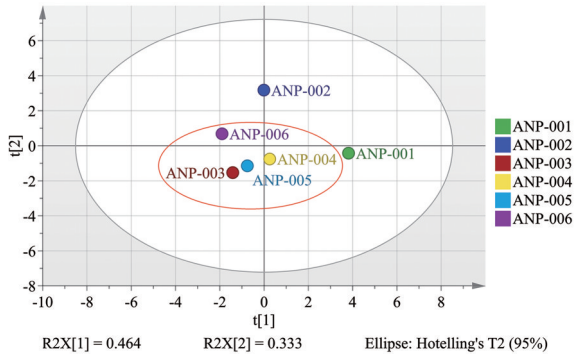


Figure 3 Principal component analysis of the six products based on the contents and *in vivo* exposure in SD rats of 11 components

量接近; 另外, 均采用人工牛黄和人工麝香的产品 ANP-005 和 ANP-006 聚集度亦十分良好。有趣的是, 虽然 ANP-003 和 ANP-005 分别采用不同来源 (天然或人工) 的牛黄和麝香, 但两者十分靠近, 提示同一家公司采用近似生产工艺可以较好地保障产品含量/体内暴露水平相似性。相对来说, 均采用天然牛黄和天然麝香生产的产品 ANP-001 与 ANP-002, 既相对于 ANP-003～006 离散, 两者之间的聚集程度也不够理想。考虑为不同公司生产品种, 可能由于中药选材/加工/炮制/制造工艺上存在差异性而影响产品含量和给药后体内暴露水平的相似性。

讨论

本研究首次整合针对胆汁酸、黄酮、生物碱等成分的 LC-MS/MS 检测方法与针对挥发性成分如 MCN、BN 的 GC-MS 检测方法, 覆盖 ANP 中 11 种关键成分, 初步解决了复方制剂成分复杂、理化性质差异大的分

析难题。并对测定浓度范围、线性、精密度、准确度等进行了方法学研究, 初步验证了方法的可行性、可靠性, 为该产品的含量测定、体内暴露水平研究等打下了良好基础。

本研究对6种常见市售产品中的11种成分含量和体内暴露水平进行了研究。总体看来, 11种成分中大多数成分的含量在ANP的6个市售产品间的差异在可接受范围内 (RSD小于50%)。但一些成分, 如HDCA、DCA、CA、CC和CRT的含量差异较大。同时, 在体内实验中, 11种成分中大部分成分的体内暴露量在ANP的6个市售产品间的差异均较大 (RSD超过50%), 仅HDCA与TCA的体内暴露量差异较低。体内暴露水平分析发现TCA、CA和GCA的血浆暴露量最高, 6种产品间CA的差异最大, 最高者是最低者的9.4倍。考虑6种市售产品来源于不同厂家, 不同产品采用的原中草药来源不同, 产品的配方、炮制、加工工艺存在差异, 可能是造成上述6个产品出现含量、给药后体内暴露水平差异的主要原因。

实验中涉及的6款ANP产品由不同来源的牛黄与麝香组成, 包括2款双天然产品 (天然牛黄和天然麝香), 2款单天然产品 (天然牛黄和人工麝香) 与2款双人工产品 (人工牛黄和人工麝香)。在组成相同的ANP产品间, 单天然产品组与双人工产品组中, 11种成分大部分成分的含量测定与体内暴露程度差异均较小 (RSD小于50%)。同时, PCA分析显示, 单天然产品组的2款ANP产品与双人工产品组的2款产品较为接近。然而, 2款双天然产品中11种成分的含量与体内暴露量差异均较大, 提示牛黄和麝香这两种特殊药材的属性 (天然来源或人工来源) 对产品中相关物质含量与体内暴露水平方面起着关键作用。以上不同产品中不同成分在含量、体内暴露水平所呈现的差异性, 提示有必要对ANP质量和生产过程进行适当监督和管理。该研究通过技术创新揭示了ANP市售产品间的质量差异性, 为中药复方制剂的质量控制提供了参考。

必须指出的是, 本研究因产品数量和检测化合物较多, 研究工作难度、工作量较大, 导致在客观上还存在一定局限性。例如, 研究中仅收集了6种市售产品, 只是现有产品的其中一部分, 涵盖的产品范围还不够充分, 并不足以代表全部ANP质量一致性。另外, 每个产品只选取了研究期间生产的一个批次的产品, 未能进行多批次检测。未来如果能增加产品数量和覆盖度, 在扩大样本量基础上增加多生产批次 (如3批产品) 的质量一致性研究, 可以更全面、更系统地评估ANP产品在不同生产单位、不同批次间的一致性与差异性。

本研究建立了11种化合物的定量方法并应用于评估6种ANP商业产品中11种成分的含量和体内暴露量。部分成分在6种ANP市售产品中含量和体内暴露量具有较高可比性, 特别是含有相同天然或人工来源的牛黄、麝香产品, 或者采用不同来源的牛黄、麝香, 但运用相似生产工艺的相同公司ANP产品间差异较小。

作者贡献: 何阿娜承担主要实验研究工作; 夏梦贝参与样品检测; 王广基、阿基业、彭英参与课题设计、技术指导、研究论文撰写。

利益冲突: 本研究与任何组织、公司和个人均不存在利益冲突。

References

[1] Barthels D, Das H. Current advances in ischemic stroke research and therapies [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866: 165260.

[2] Chen H, Luo Y, Tsoi B, et al. Angong Niuhuang Wan reduces hemorrhagic transformation and mortality in ischemic stroke rats with delayed thrombolysis: involvement of peroxynitrite-mediated MMP-9 activation [J]. Chin Med, 2022, 17: 51.

[3] Bai X, Zheng E, Tong L, et al. Angong Niuhuang Wan inhibit ferroptosis on ischemic and hemorrhagic stroke by activating PPARγ/AKT/GPX4 pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 321: 117438.

[4] Zhang X, Pei J, Xue L, et al. An-Gong-Niu-Huang-Wan (AGNHW) regulates cerebral blood flow by improving hypoperfusion, cerebrovascular reactivity and microcirculation disturbances after stroke [J]. Chin Med, 2024, 19: 73.

[5] Wang Q, Sun AY, Simonyi A, et al. Neuroprotective mechanisms of curcumin against cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis and behavioral deficits [J]. J Neurosci Res, 2005, 82: 138-148.

[6] Ran Y, Su W, Gao F, et al. Curcumin ameliorates white matter injury after ischemic stroke by inhibiting microglia/macrophage pyroptosis through NF-κB suppression and NLRP3 inflammasome inhibition [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 1552127.

[7] Li CX, Wang XQ, Cheng FF, et al. Hyodeoxycholic acid protects the neurovascular unit against oxygen-glucose deprivation and reoxygenation-induced injury *in vitro* [J]. Neural Regen Res, 2019, 14: 1941-1949.

[8] Jung J, Lu Z, de Smith A, et al. Novel insight into the etiology of ischemic stroke gained by integrative multiome-wide association study [J]. Hum Mol Genet, 2024, 33: 170-181.

[9] Li C, Wang X, Yan J, et al. Cholic acid protects *in vitro* neurovascular units against oxygen and glucose deprivation-induced injury through the BDNF-TrkB signaling pathway [J]. Oxid Med

Cell Longev, 2020, 2020: 1201624.

[10] Hao Z, Zhang Z, Zhao Y, et al. Baicalin reduces immune cell infiltration by inhibiting inflammation and protecting tight junctions in ischemic stroke injury [J]. Am J Chin Med, 2023, 51: 355-372.

[11] Duan L, Zhang Y, Yang Y, et al. Baicalin inhibits ferroptosis in intracerebral hemorrhage [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 629379.

[12] Wang F, Li WL, Shen LJ, et al. Crocin alleviates intracerebral hemorrhage-induced neuronal ferroptosis by facilitating Nrf2 nuclear translocation [J]. Neurotox Res, 2022, 40: 596-604.

[13] Zhou XQ, Zeng XN, Kong H, et al. Neuroprotective effects of berberine on stroke models *in vitro* and *in vivo* [J]. Neurosci Lett, 2008, 447: 31-36.

[14] Liu F, Cao L, Hu S, et al. Muscone promotes functional recovery by facilitating microglia polarization into M2 phenotype through PPAR-γ pathway after ischemic stroke [J]. Cell Immunol, 2023, 386: 104704.

[15] Ma R, Lu D, Xie Q, et al. *l*-Borneol and *d*-borneol promote trans-differentiation of astrocytes into neurons in rats by regulating Wnt/Notch pathway to exert neuroprotective effect during recovery from cerebral ischaemia [J]. Phytomedicine, 2023, 109: 154583.

[16] Mi X, Li ZY, Qin XM, et al. Monitoring of chemical components with different color traits of *Tussilago farfara* L. using NMR-based metabolomics [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2013, 48: 1692-1697.

[17] He P, Li ZY, Fan SC, et al. Differences between Hengshan-huangqi and Chuanghuangqi based on metabolomics and ITS2 sequences [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2013, 48: 1595-1601.

[18] Li ZY, Fan ML, Qin XM. Comparison of chemical composition between raw and vinegar-backed Paeoniae Radix Alba using NMR based metabolomic approach [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2015, 50: 211-217.

[19] Xie J, Tang Q, Zhang P, et al. Study on quality evaluation of Gegen Qinlian decoction based on UHPLC fingerprint and multi-component quantification [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2024, 59: 2365-2371.

[20] Tian T, Shi R, Wu JS, et al. Study on multi-component contents of Jinqi Jiangtang Capsule [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2024, 59: 2849-2856.

[21] Li T, Wang YW, Wang YL, et al. LC-MS quantification and pharmacokinetics of the multi-constituents of Huangqin Tang in rat plasma after different single oral doses [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2013, 48: 917-924.