·实验研究·

银翘清热片中5种成分在大鼠体内的生物利用度研究

谭玉蓉[1,2],尹铭钶[1,2],冯　健[1,2],陈夏霖[1,2],王冬慧[1,2],王佳佳[1,2],曹　亮[1,2],王振中[1,2],肖　伟[1,2*],高　霞[1,2*]

(1 江苏康缘药业股份有限公司/南京中医药大学中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室,南京 211112;2 江苏康缘药业股份有限公司,连云港 222001)

[摘要] **目的:**评估银翘清热片中5种主要成分在大鼠血浆中动态变化规律与生物利用度。**方法:**应用超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用法(UPLC-TQ-MS)建立并验证血浆中5种成分同时定量的分析方法。大鼠随机分为3组,第1组按0.153 7 g生药量·kg^{-1} *ig*给予银翘清热片,第2组*ig*给予与第1组等浓度的5种成分混合溶液,第3组按照1 mg·kg^{-1}于尾*iv*5种成分混合溶液,测定不同时间点大鼠血浆中5种成分的浓度,运用非房室模型计算药动学参数并计算绝对生物利用度与相对生物利用度。**结果:**血浆中5种成分分析方法专属性良好,线性关系良好($r>0.99$),提取回收率与基质效应RSD<15%,批内、批间精密度和准确度以及稳定性均符合要求。复方给药后5种成分平均达峰时间为0.083~1.35 h,消除半衰期均小于4 h,且复方能够延长成分的消除半衰期和体内驻留时间。绿原酸、葛根素、异阿魏酸、咖啡酸、阿魏酸的绝对生物利用度分别为0.84%、1.50%、45.17%、23.82%、32.97%,相对生物利用度均较高(82%~94%)。**结论:**本研究建立的血浆样品分析方法快速、稳定、准确。银翘清热片口服后可快速吸收入血,异阿魏酸的血浆暴露量与绝对生物利用度最大。其复方配伍有利于疗效充分发挥,对5种成分的绝对生物利用度影响较小。

[关键词] 银翘清热片;超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用法;生物利用度;血浆暴露量;药动学

[中图分类号] R96　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003-3734(2026)07-0754-10

Bioavailability study of five components of Yinqiao Qingre tablets in rats

TAN Yu-rong[1,2], YIN Ming-ke[1,2], FENG Jian[1,2], CHEN Xia-lin[1,2], WANG Dong-hui[1,2], WANG Jia-jia[1,2], CAO Liang[1,2], WANG Zhen-zhong[1,2], XIAO Wei[1,2*], GAO Xia[1,2*]

(1 *State Key Laboratory of Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutical Process Control and Intelligent Manufacture, Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd. & Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing* 211112, *China*; 2 *Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang* 222001, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To evaluate the *in vivo* dynamic change patterns and bioavailability of 5 main components in Yinqiao Qingre tablets in rat plasma. **Methods**: A UPLC-TQ-MS method was established and validated for the simultaneous quantification of the 5 components in plasma. Rats were randomly divided into three groups: Group 1 was given Yinqiao Qingre tablets by intragastric administration (*ig*) at a dose of 0.153 7 g·kg^{-1} crude drug; Group 2 was given a mixed solution of the 5 components at the same concentration as that in the first group via *ig*; gGroup 3 was intravenously injected (via tail vein) with the mixed solution of the 5 components at a dose of 1 mg·kg^{-1}. Plasma concentrations of the 5 components at different time points were determined. Pharmacokinetic parameters were calculated using a non-compartmental model, and absolute and relative bioavailability values were further computed. **Results**: The specificity of the 5 components analysis methods in plasma was good, the linear

[基金项目] 江苏省基础研究计划自然科学基金——前沿引领技术基础研究专项资助项目(BK20232014);中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室定向课题资助项目(SKL2023D01003)

[作者简介] 谭玉蓉,女,硕士,主要从事药物分析研究。E-mail:17626053544@163.com。

[通讯作者] *肖伟,男,教授,博士生导师,主要从事中药新药研发及过程质量控制研究。联系电话:(0518)81522367,E-mail:kanionlunwen@163.com。*高霞,女,硕士,副主任药师,主要从事中药化学成分和药动学研究。E-mail:gaoxia0218@163.com。

[DOI]10.20251/j.cnki.1003-3734.2026.07.012

relationship was good ($r > 0.99$), the extraction recovery and matrix effect RSD were less than 15%, and the precision, accuracy and stability within and between batches met the requirements. The average peak time (T_{max}) of the five components was 0.083 ~ 1.35 h, and the terminal elimination half-life ($t_{1/2}$) was less than 4 h. Moreover, the compound preparation could prolong the elimination half-life and *in vivo* residence time of the components. The absolute bioavailabilities of chlorogenic acid, puerarin, isoferulic acid, caffeic acid, and ferulic acid were 0.84%, 1.50%, 45.17%, 23.82%, and 32.97%, respectively, while their relative bioavailabilities were all relatively high (ranging from 82% to 94%). **Conclusion**: The established analytical method for plasma samples is rapid, stable, and accurate. Yinqiao Qingre tablets can be rapidly absorbed into the blood after oral administration, with isoferulic acid showing the highest plasma exposure and absolute bioavailability. The compatibility of the compound preparation is beneficial for the full exertion of therapeutic effects, and has little impact on the absolute bioavailability of the 5 components.

[**Key words**] Yinqiao Qingre tablets; UPLC-TQ-MS; bioavailability; plasma exposure; pharmacokinetics

银翘清热片出自《温热经解》中方剂银翘败毒汤，由中国工程院院士王永炎教授加减化裁而来，主要由葛根、金银花、连翘、牛蒡子、蝉蜕、板蓝根、薄荷、知母、升麻9味中药制成，具有辛凉解表，清热解毒的功效，用于外感风热型普通感冒，症见发热、咽痛、恶风、鼻塞、流涕、头痛、全身酸痛、汗出、咳嗽、口干、舌红、脉数[1]。临床研究显示[2-5]，银翘清热片具有抗病毒（甲、乙型流感病毒）、抑菌、解热、抗炎作用。

目前，银翘清热片在体内的吸收代谢规律尚不清楚。银翘清热片中共鉴定到葛根素、绿原酸、连翘苷等49种化学成分[6]。其中葛根素、大豆苷等黄酮类化合物既是葛根的特征性成分，也是其主要的活性成分，具有降血压、抗动脉粥样硬化、抗缺血再灌注损伤等多种药理活性[7]；绿原酸、咖啡酸、阿魏酸等有机酸类化合物是金银花中的主要活性成分，以绿原酸为主，占比约3% ~5%[8-10]。异阿魏酸是升麻中酚酸类活性成分，具有解热、镇痛、消炎的作用[11]。基于上述已被证实有活性的成分，通过药代预实验，筛选出血浆中含量较高的绿原酸、葛根素、咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸等5种成分为目标成分，运用超高效液相色谱-三重四级杆质谱联用（UPLC-TQ-MS）技术建立快速、准确、稳定的血浆样品定量方法，评估银翘清热片在大鼠血浆中药动学特征与生物利用度。

材料与方法

1 实验仪器

LC－30AD型高效液相色谱仪（日本岛津公司），AB API 4000$^+$型质谱仪（美国AB公司）；Auto EVA Mini型全自动平行浓缩仪（睿科集团股份有限公司）；XW－80A型微型涡旋混合仪（上海沪西分析仪器厂有限公司）；BY－R20型医用离心机（北京白洋医疗器械有限公司）；－80 ℃医用低温冰箱［赛默飞世尔（苏州）仪器有限公司］；BCD－539WT型冰箱（青岛海尔股份有限公司）；KH300DB型超声波清洗仪（昆山禾创仪器有限公司）；Mettler XS205型电子天平（梅特勒-托利多上海有限公司）；Mettler ME303E型电子天平（梅特勒-托利多上海有限公司）；Milli-Q Reference纯水仪（默克公司）。

2 实验试剂

银翘清热片（批号：230303，规格：36片·盒$^{-1}$），由江苏康缘药业股份有限公司生产，其中绿原酸、葛根素、异阿魏酸、咖啡酸、阿魏酸含量分别为4.0、7.1、0.5、0.9、0.2 mg·g^{-1}；绿原酸（批号：110753-201817，规格：20 mg·支$^{-1}$，纯度：96.8%），葛根素（批号：110752-202217，20 mg·支$^{-1}$，纯度：95.4%），异阿魏酸（批号：111698-201904，规格：20 mg·支$^{-1}$，纯度：99.3%），阿魏酸（批号：110773-201614，规格：20 mg·支$^{-1}$，纯度：99%），氢化可的松（批号：100152-202008，规格：50 mg·支$^{-1}$，纯度：99.7%）均购自中国食品药品检定研究院；咖啡酸（上海永恒生物科技有限公司，批号：YH-140428，规格：20 mg·支$^{-1}$，纯度：98%），葛根素原料药（批号：D105798，规格：1 g·支$^{-1}$，纯度：≥98%），绿原酸原料药（批号：D105232，规格：1 g·支$^{-1}$，纯度：≥98%），咖啡酸原料药（批号：D105931，规格：5 g·支$^{-1}$，纯度：≥98%），阿魏酸原料药（批号：D105903，规格：5 g·支$^{-1}$，纯度：≥98%），异阿魏酸原料药（批号：D105665，规格：1 g·支$^{-1}$，纯度：≥98%）均购自南京狄尔格医药科技有限公司，甲醇（LC-MS，纯度：≤100%，批号：I1243235239），乙腈（LC-MS，纯度：≤100%，批号：I1240829242）均

购自默克公司,纯水。

3 实验动物

SD 大鼠 18 只,雄性,体重 180 ~ 220 g,供应商:杭州医学院,生产许可证号:SCXK(浙)2024-0001。于室温(23 ± 2) ℃,相对湿度(60 ± 10)%,12 h 光照和 12 h 黑暗的日夜循环适应性饲养 1 周。本实验的动物饲养和实验操作均严格遵循江苏康缘药业股份有限公司实验动物伦理委员会的规章和制度(IACUC 审查号:2024022006)。

4 给药溶液的配制

4.1 银翘清热片复方给药溶液配制 取银翘清热片,粉碎成粉末,称取适量于锥形瓶中,加入 0.5% CMC-Na 溶液,涡旋、超声,配制成浓度为 0.454 g·mL^{-1} 的银翘清热片复方 *ig* 给药溶液,相当于 1.537 g 生药量·mL^{-1},备用。

4.2 5 种成分组合给药溶液配制 称取与银翘清热片复方给药溶液中含量等量的绿原酸、葛根素、异阿魏酸、咖啡酸、阿魏酸的原料药分别为:72.58、128.82、9.07、16.33、3.63 mg,加入 0.5% CMC-Na,混匀、超声配制成成分组合 *ig* 给药溶液,备用。

4.3 5 种成分注射液的配制 称取绿原酸、葛根素、异阿魏酸、咖啡酸、阿魏酸的原料药适量,加入含 10%(*w*/*v*)聚乙二醇-15 羟基硬脂酸酯的生理盐水溶液配制成浓度 0.4 mg·mL^{-1} 的 *iv* 给药溶液,备用。

5 溶液的配制

5.1 内标溶液 精密称定氢化可的松对照品适量,用甲醇配制成浓度为 1 mg·mL^{-1} 的储备液。精密吸取氢化可的松储备液与甲酸适量,用乙腈溶液稀释成含 125 ng·mL^{-1} 氢化可的松同时含 0.1% 甲酸的乙腈溶液,置于 -20 ℃冰箱备用。

5.2 对照品储备液 取绿原酸、葛根素、异阿魏酸、咖啡酸、阿魏酸对照品适量,精密称定,加入甲醇超声使其溶解,配制成浓度为 1 mg·mL^{-1} 的单一成分对照品储备液,置于 -20 ℃冰箱备用。

5.3 混合标准工作液 各对照品储备液稀释 10 倍后,分别精密吸取适量,用 50% 甲醇溶液稀释制备成混合标准工作液 HB1(绿原酸、葛根素、异阿魏酸、咖啡酸,阿魏酸的浓度分别是:4 000、15 000、4 800、3 100、2 500 ng·mL^{-1})。随后,精密吸取 650 μL HB1,加入 50% 甲醇溶液稀释成 HB2,同样稀释方法制备获得 HB3 ~ HB8。此外,另精密吸取适量对照品储备液,配制定量下限(lower limit of quantification,LLOQ)的混合标准工作液与低、中、高浓度质量控制(quality control,QC)样品,绿原酸、葛根素、异阿魏酸、咖啡酸、阿魏酸的终浓度分别为① LLOQ:196.1、735.3、235.3、152、122.6 ng·mL^{-1};② QC-L:400、1 500、480、310、250 ng·mL^{-1};③ QC-M:1 600、6 000、1 920、1 240、1 000 ng·mL^{-1};④ QC-H:3 200、12 000、3 840、2 480、2 000 ng·mL^{-1}。

6 UPLC-TQ-MS 检测条件

色谱条件:色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C_{18} 柱(50 mm × 3.0 mm,1.8 μm);柱温 40 ℃;流速 0.6 mL·min^{-1};进样量 2 μL;流动相为 A(0.1% 甲酸水溶液)-B(乙腈)体系,梯度洗脱,具体洗脱梯度如下,乙腈:0.01 ~ 1 min,5% ~ 13%;1 ~ 8.5 min,13% ~ 14%;8.5 ~ 13 min,14% ~ 25%;13 ~ 13.5 min,25% ~ 90%;13.5 ~ 14 min,90%;14 ~ 14.5 min,90% ~ 5%;15 min,stop。

质谱条件:ESI 源,离子源温度:500 ℃;雾化气(GS1)和辅助气(GS2)均为零级空气,GS1 50 psi,GS2 60 psi;气帘气 25 psi;碰撞气(collision gas)8 psi;离子化电压:-4 500 V;扫描方式为多反应监测模式(multiple reaction monitoring,MRM)。定量分析的检测离子对见表 1。

表 1 5 种成分及内标定量分析的检测离子对及质谱参数

成分	保留时间/min	母离子(*m*/*z*)	子离子(*m*/*z*)	去簇电压/V	碰撞能量/V
绿原酸	1.79	352.9[M - H]$^-$	191.2	-47	-23
葛根素	2.23	415.0[M - H]$^-$	294.8	-102	-33
异阿魏酸	4.69	193.1[M - H]$^-$	134.2	-51	-22
咖啡酸	2.09	178.6[M - H]$^-$	134.9	-55	-22
阿魏酸	4.04	193.1[M - H]$^-$	134.0	-61	-19
氢化可的松	13.70	360.8[M - H]$^-$	331.2	-65	-15

7 大鼠血浆样品的处理

取大鼠血浆样品 100 μL,加入 400 μL "**5.1**" 项下配制的含氢化可的松和甲酸的冰乙腈溶液,涡旋混匀 1 min,12 000 r·min^{-1} 离心 10 min,取上清液,氮气吹干,残留物用 100 μL 50% 甲醇溶液复溶,涡旋 1 min,12 000 r·min^{-1} 离心 10 min,取上清

液进样分析。

8 方法学验证

8.1 专属性 取6只大鼠空白血浆100 μL,分别加入400 μL含0.1%甲酸的乙腈溶液,余下操作按照“**5**”项下方法对样品处理后得到大鼠空白血浆样品。取6只大鼠空白血浆90 μL,分别加入10 μL“**5.3**”项下浓度为LLOQ的混合标准工作液,按照“**5**”项下方法对样品处理后得到LLOQ样品。取给药后30 min大鼠血浆100 μL,按照“**5**”项下方法对样品处理后得到给药后血浆样品。上述样品均进行UPLC-TQ-MS分析。

8.2 线性范围考察 取90 μL空白血浆若干份,分别依次加入“**5.3**”项下系列混合标准工作液(HB1 ~ HB8)10 μL,得到系列混合对照品溶液,按照“**5**”项下方法对样品处理后进行UPLC-TQ-MS分析。以各成分的浓度为自变量(x),样品中各成分与内标的峰面积比值为因变量(y),采用加权最小二乘法($1/x^2$),计算5种成分在大鼠血浆样品中的线性回归方程。

8.3 定量下限 取大鼠空白血浆90 μL,分别加入10 μL“**2.3**”项下浓度为LLOQ的混合标准工作液,平行制备6份,按照“**5**”项下方法对样品处理并进行UPLC-TQ-MS分析。由当日随行标准曲线回归计算样本中各指标性成分的浓度,计算准确度和精密度。

8.4 精密度和准确度 取空白血浆90 μL,加入“**5.3**”项下LLOQ与高、中、低浓度的QC样品工作液10 μL,按照“**5**”项下方法处理后进行UPLC-TQ-MS分析,通过连续测定3批LLOQ样品和QC样品来评估方法的精密度与准确度,分析批之间至少间隔12 h,每批平行制备6个样品,根据每批随行标准曲线,计算血浆样品中5种成分的测定浓度,并计算3个浓度QC样品与LLOQ样品的批内和批间精密度与准确度。

8.5 提取回收率与基质效应 取空白血浆若干份,按照以下3种方式处理:第1组取空白血浆90 μL,加入“**5.3**”项下高、中、低浓度QC样品工作液10 μL,得到高、中、低浓度QC样品,按照“**5**”项下方法处理后进行UPLC-TQ-MS分析,每一浓度平行制备6份;第2组取不同来源空白血浆90 μL,加入10 μL 50%甲醇,再加入400 μL含甲酸的冰乙腈,余下操作按照“**5**”项下方法处理至氮气吹干,然后加入“**5.3**”项下高、中、低浓度QC样品工作液10 μL与浓度为5 000 ng·mL^{-1}的内标溶液10 μL,再加入80 μL 50%甲醇溶液,12 000 r·min^{-1}离心10 min,取上清液进行UPLC-TQ-MS分析,每一浓度平行制备6份;第3组制备目标分析物等浓度标准溶液:取“**5.3**”项下高、中、低浓度QC样品工作液10 μL,加入10 μL浓度为5 000 ng·mL^{-1}的内标溶液,再加入80 μL 50%甲醇溶液后直接进行UPLC-TQ-MS分析,每一浓度平行制备6份。第1组所得待测物峰面积与第2组中同浓度样品所得待测物峰面积的比值为待测物的提取回收率。第2组所得待测物的峰面积与第3组同浓度样品所得待测物平均峰面积的比值为待测物基质因子;待测物基质因子与内标基质因子的比值为经内标归一化的分析物基质因子,为待测物的基质效应。

8.6 稀释可靠性考察 取空白血浆90 μL,加入高于定量上限浓度的5种成分的混合标准工作液10 μL(绿原酸、葛根素、异阿魏酸、咖啡酸、阿魏酸的浓度分别为35 000、70 000、40 000、25 000、22 000 ng·mL^{-1},按照“**4**”项下方法进行样品处理,制备成含绿原酸、葛根素、异阿魏酸、咖啡酸、阿魏酸的浓度分别为3 500、7 000、4 000、2 500、2 200 ng·mL^{-1}的待稀释样品,再用处理过的空白血浆样品将其稀释10倍后进行UPLC-TQ-MS分析,平行制备6份。

8.7 稳定性考察 取空白血浆90 μL,加入“**5.3**”项下低、高浓度QC样品工作液10 μL,以不同的储存方式处置,包括室温放置1 h、经过3个周期(-80 ℃至室温)的冻融循环、-80 ℃存放1个月,以及处理后进样盘放置24 h后按照“**5**”项下方法配制成低、高浓度的QC样品各6份后进样分析,根据每个条件下随行标准曲线,计算血浆样品中5种成分的测定浓度。

9 药动学与生物利用度研究

取健康雄性大鼠18只,随机分为3组,每组6只,第1组:复方 *ig* 给药组,第2组:成分组合物 *ig* 给药组,第3组:成分组合物 *iv* 给药组。实验前禁食12 h,不禁水。分别于给药前(0 h)和给药后0.083、0.167、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、4、6、8、10、24 h于大鼠眼眶静脉采血约200 μL,置于肝素化离心管中,以8 000 r·min^{-1}离心5 min,收集上清血浆样品,按“**4**”项下方法操作,进样分析。

10 数据处理

利用Analyst 1.6.1软件根据随行标准曲线计算血浆样品中各成分的浓度,利用GraphPad Prism10绘制血浆中5种成分浓度-时间曲线,导入DAS 3.2.8软件使用非房室模型计算药动学参数,包括药物浓度-时间曲线下面积(AUC)、最大浓度(C_{max})、达峰

时间(T_{max})和末端消除半衰期($t_{1/2}$)等,使用 GraphPad Prism10 对成分组合给药组与复方给药组的各药动参数进行显著性分析,计算各成分的血浆暴露量占 5 种成分总暴露量的比例,并绘制饼图,使用如下计算公式计算绝对生物利用度与相对生物利用度。

$$F_{abs}=\frac{AUC_{ig}\times D_{iv}}{AUC_{iv}\times D_{ig}}\times 100\% \quad 式(1)$$

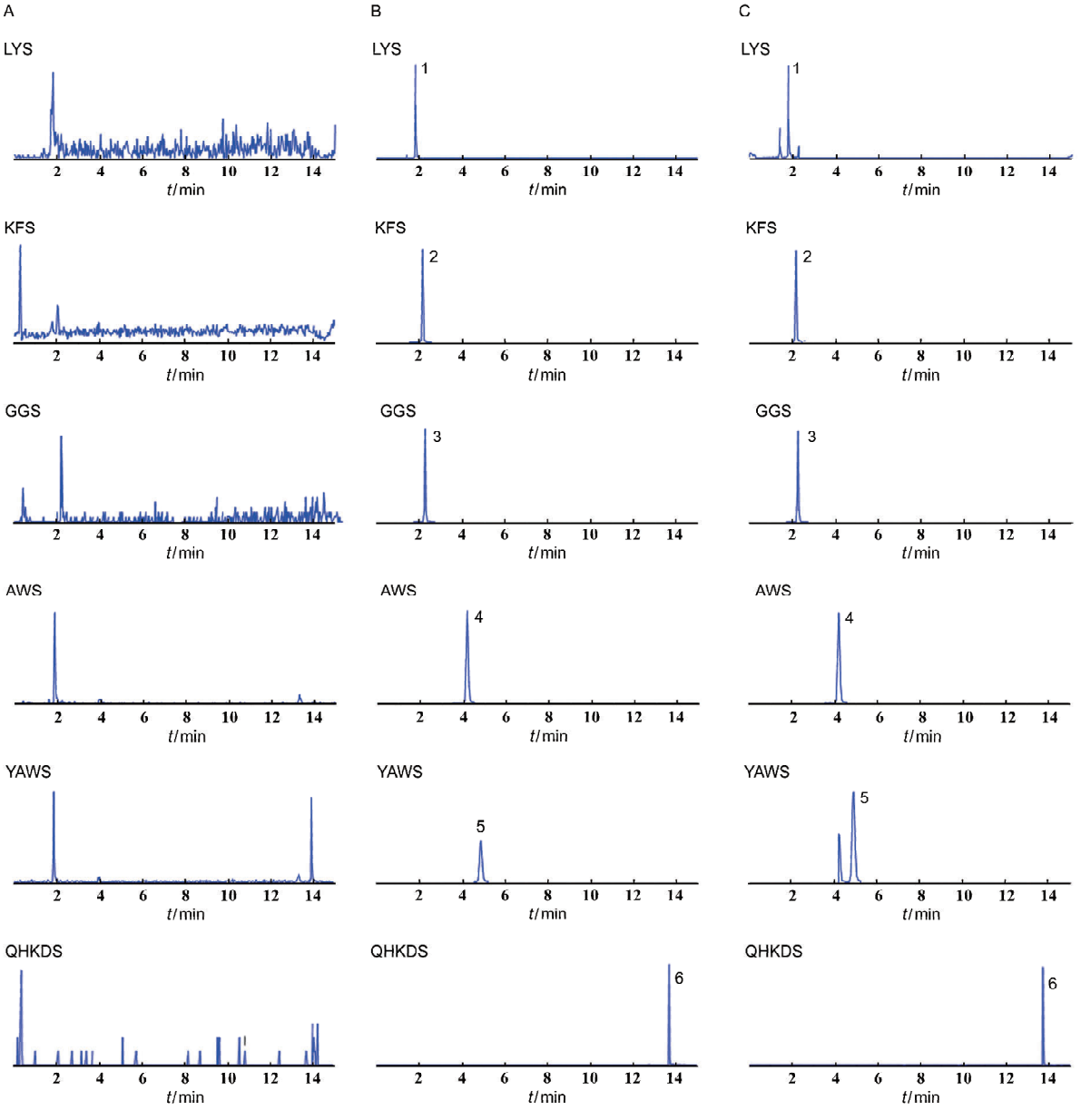
$$F_{Rel}=\frac{AUC_{T}\times D_{R}}{AUC_{R}\times D_{T}}\times 100\% \quad 式(2)$$

式中 D 为给药剂量,T 表示复方 *ig* 给药,R 表示成分组合物 *ig* 给药。

结　果

1　分析方法学验证

1.1　专属性　空白血浆样品中 5 种成分的干扰峰的峰面积均低于 LLOQ 样品的 20%,空白血浆样品中内标干扰峰的峰面积均低于 LLOQ 样品的 5%,并得到典型色谱图,见图 1,5 种成分和内标的检测不存在内源性物质干扰,表明该方法专属性良好。



A:空白血浆样品;B:LLOQ 样品;C:给药后 30 min 血浆样品;1:绿原酸;2:咖啡酸;3:葛根素;4:阿魏酸;5:异阿魏酸;6:氢化可的松

图 1　专属性色谱图

1.2 标准曲线与线性范围 5 种成分在相应浓度范围内线性关系良好,见表 2,均能够满足生物样品分析方法要求。

表 2 大鼠血浆中 5 种化学成分标准曲线及线性范围

分析物	标准曲线	r	范围/ng·mL^{-1}	定量下限/ng·mL^{-1}
绿原酸	$y=0.012\ 2x+0.565$	0.997 4	19.61 ~ 400	19.61
葛根素	$y=0.005\ 46x+0.019\ 7$	0.998 8	73.53 ~ 1 500	73.53
异阿魏酸	$y=0.000\ 573x-0.000\ 96$	0.998 8	23.53 ~ 480	23.53
咖啡酸	$y=0.028\ 9x+0.094\ 8$	0.997 7	15.20 ~ 310	15.20
阿魏酸	$y=0.002\ 78x+0.000\ 084\ 6$	0.996 2	12.26 ~ 250	12.26

1.3 定量下限 5 种成分实测浓度的准确度为 96.68% ~ 111.67%,RSD 为 4.58% ~ 12.33%,均在 ±20% 之间,符合生物样品分析方法要求。

1.4 精密度与准确度 低、中、高浓度 QC 样品以及定量下限样品中 5 种成分实测浓度的批内精密度准确度在 93.93% ~ 111.67%,RSD 为 3.82% ~ 12.33%,批间精密度准确度在 90.27% ~ 111.97%,RSD 为 2.40% ~ 11.12%,均 <15%,见表 3,表明该方法的精密度与准确度良好,符合生物样品分析方法要求。

表 3 大鼠血浆中 5 种成分的精密度、准确度、提取回收率、基质效应和稀释可靠性 $\bar{x}\pm s$, $n=6$

成分	浓度	批内($n=6$)		批间($n=18$)		提取回收率/%		基质效应		稀释可靠性/%	
	/ng·mL^{-1}	准确度/%	RSD/%	准确度/%	RSD/%	测定值/%	RSD/%	测定值	RSD/%	准确度/%	RSD/%
绿原酸	19.61	111.67 ± 6.41	12.33	99.56 ± 12.31	5.64	—	—	—	—		
	40	107.67 ± 3.33	3.82	107.89 ± 4.09	3.11	96.37 ± 14.1	14.63	0.92 ± 0.10	10.70		
	160	95.67 ± 7.38	6.16	93.57 ± 5.72	7.88	75.01 ± 5.31	7.08	1.20 ± 0.03	2.62		
	320	95.68 ± 6.07	5.40	97.87 ± 5.27	6.24	77.75 ± 4.07	5.23	0.92 ± 0.04	4.74		
	3 500	—	—	—	—	—	—	—	—	102.63 ± 5.58	5.27
葛根素	73.53	99.80 ± 3.82	6.06	99.91 ± 6.04	8.32	—	—	—	—		
	150	105.83 ± 2.56	5.04	104.38 ± 5.29	2.40	94.97 ± 5.91	6.22	1.04 ± 0.08	7.24		
	600	98.27 ± 8.58	7.29	105.92 ± 7.74	8.70	84.37 ± 5.00	5.39	0.98 ± 0.08	7.95		
	1 200	97.48 ± 6.06	6.66	103.71 ± 6.85	6.26	89.20 ± 3.83	4.29	0.93 ± 0.04	4.83		
	7 000	—	—	—	—	—	—	—	—	106.40 ± 6.30	5.89
异阿魏酸	23.53	103.55 ± 8.79	9.55	100.86 ± 9.65	8.38	—	—	—	—		
	48	92.37 ± 5.98	4.76	90.27 ± 4.33	6.39	98.99 ± 13.65	13.79	1.14 ± 0.13	11.75		
	192	97.72 ± 7.12	6.92	92.32 ± 6.41	7.22	94.39 ± 4.26	4.51	1.05 ± 0.11	10.92		
	384	108.40 ± 5.54	9.90	97.66 ± 9.55	5.04	83.81 ± 2.70	3.23	0.99 ± 0.05	5.49		
	4 000	—	—	—	—	—	—	—	—	95.05 ± 3.01	3.20
咖啡酸	15.2	96.68 ± 10.57	10.41	100.39 ± 10.40	11.12	—	—	—	—		
	31	96.22 ± 9.52	9.18	107.13 ± 9.77	9.77	98.97 ± 5.52	5.58	1.12 ± 0.13	11.44		
	124	95.20 ± 5.13	7.93	105.07 ± 8.34	5.44	88.73 ± 4.08	4.60	0.99 ± 0.06	6.07		
	248	94.30 ± 5.27	8.43	105.38 ± 8.91	5.71	91.80 ± 3.60	3.92	0.95 ± 0.03	3.02		
	2 500	—	—	—	—	—	—	—	—	110.32 ± 5.79	5.31
阿魏酸	12.26	109.90 ± 8.27	4.58	111.97 ± 5.05	7.59	—	—	—	—		
	25	98.13 ± 3.81	5.04	100.44 ± 4.99	4.02	102.61 ± 5.41	5.28	1.24 ± 0.14	12.05		
	100	93.93 ± 3.13	4.72	94.41 ± 4.45	3.33	97.17 ± 2.19	2.26	0.95 ± 0.05	5.69		
	200	99.88 ± 5.73	6.34	99.81 ± 6.45	5.66	86.35 ± 3.62	4.19	1.01 ± 0.05	4.66		
	2 200	—	—	—	—	—	—	—	—	107.03 ± 6.15	5.58

1.5　提取回收率与基质效应　5 种成分在低、中、高浓度水平下的提取回收率为 75.01% ~102.61%，RSD 为 2.26% ~14.63%，基质效应为 0.92 ~1.24，RSD 为 2.62% ~12.05%，见表 3，符合生物样品分析方法要求。

1.6　稀释可靠性　样品稀释后 5 种成分的测定浓度准确度均在 85% ~115% 之间，RSD 为 3.20% ~5.89%，见表 3，符合生物样品分析方法要求。

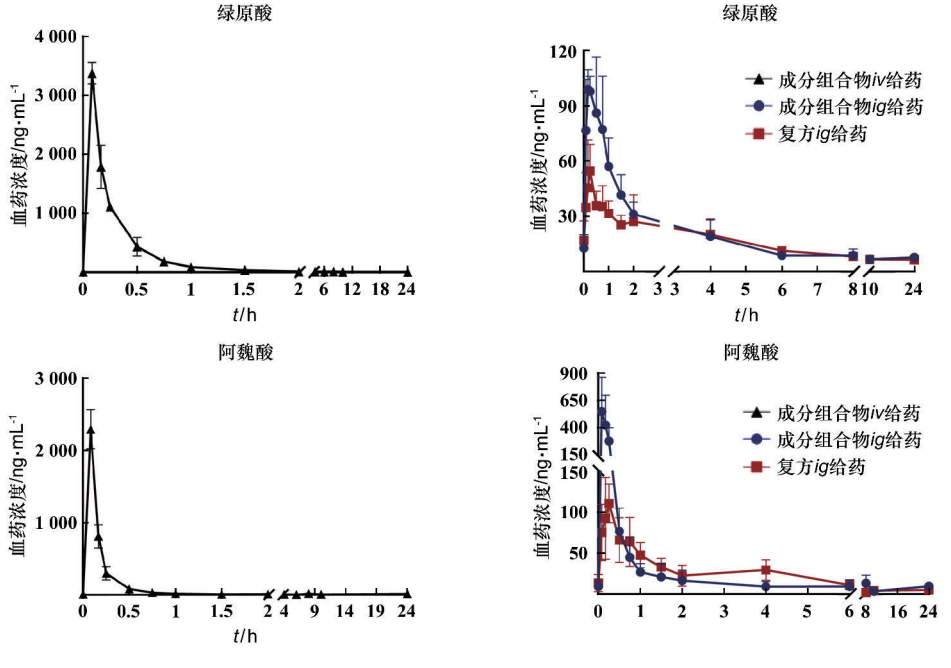
1.7　稳定性　5 种成分的大鼠血浆样品室温放置 1 h 稳定（准确度在 96.78% ~114.17% 之间，RSD 为 1.09% ~7.08%）、4 ℃放置 24 h 稳定（准确度在 91.38% ~105.57% 之间，RSD 为 2.06% ~6.06%）、经过 3 个周期（-80 ℃至室温）的冻融循环稳定（准确度在 90.72% ~104.68% 之间，RSD 为 1.93% ~5.80%）、样品在 -80 ℃存放 1 个月后仍可保持稳定（准确度在 93.02% ~105.22% 之间，RSD 为 1.56% ~6.941%）。表明待测样品在不同的储存环境下稳定性良好，见表 4，符合生物样品分析方法要求。

表 4　大鼠血浆中 5 种成分在不同储存条件下的稳定性　　$\bar{x} \pm s$，$n = 6$

成分	浓度 /ng·mL^{-1}	室温 1 h		反复冻融 3 次		进样盘放置 24 h		-80 ℃放置 1 个月	
		准确度/%	RSD/%	准确度/%	RSD/%	准确度/%	RSD/%	准确度/%	RSD/%
绿原酸	40	107.67 ±3.39	3.17	104.68 ±5.93	5.80	105.57 ±5.08	4.75	103.23 ±4.98	4.95
	320	108.17 ±3.06	2.87	103.67 ±5.96	5.67	94.28 ±3.02	3.20	90.97 ±5.47	6.02
葛根素	150	106.50 ±2.07	1.72	102.52 ±4.96	4.83	94.58 ±5.86	6.06	94.97 ±6.79	6.94
	1 200	102.72 ±2.73	2.65	96.70 ±4.90	4.98	101.07 ±3.26	3.24	93.02 ±3.20	3.39
异阿魏酸	48	96.78 ±5.05	5.25	90.72 ±2.62	2.87	91.75 ±1.91	2.06	100.48 ±3.87	3.83
	384	100.92 ±1.35	1.33	93.80 ±3.08	3.31	91.38 ±3.06	3.36	93.80 ±4.05	4.19
咖啡酸	31	99.67 ±7.11	7.08	103.67 ±1.86	1.93	105.00 ±3.90	3.63	105.22 ±4.70	4.29
	248	105.55 ±4.35	4.08	98.57 ±4.32	4.49	103.52 ±5.58	5.44	99.95 ±3.84	3.68
阿魏酸	25	114.17 ±1.33	1.09	92.45 ±2.11	2.25	103.27 ±3.35	3.24	102.50 ±1.64	1.56
	200	100.88 ±3.12	2.86	97.77 ±4.33	4.54	94.95 ±2.47	2.55	100.72 ±3.89	3.93

2　银翘清热片及其主要成分组合物在大鼠血浆中动态变化规律比较

大鼠血浆中各成分的平均浓度-时间曲线图见图 2，药动学参数见表 5，绝对生物利用度与相对生物利用度计算结果见表 6，银翘清热片在大鼠体内暴露量较高的 5 种成分给药后可快速吸收与消除，0.083 ~1.35 h 内达峰（T_{max} <1 h），$t_{1/2}$ 均小于 4 h。



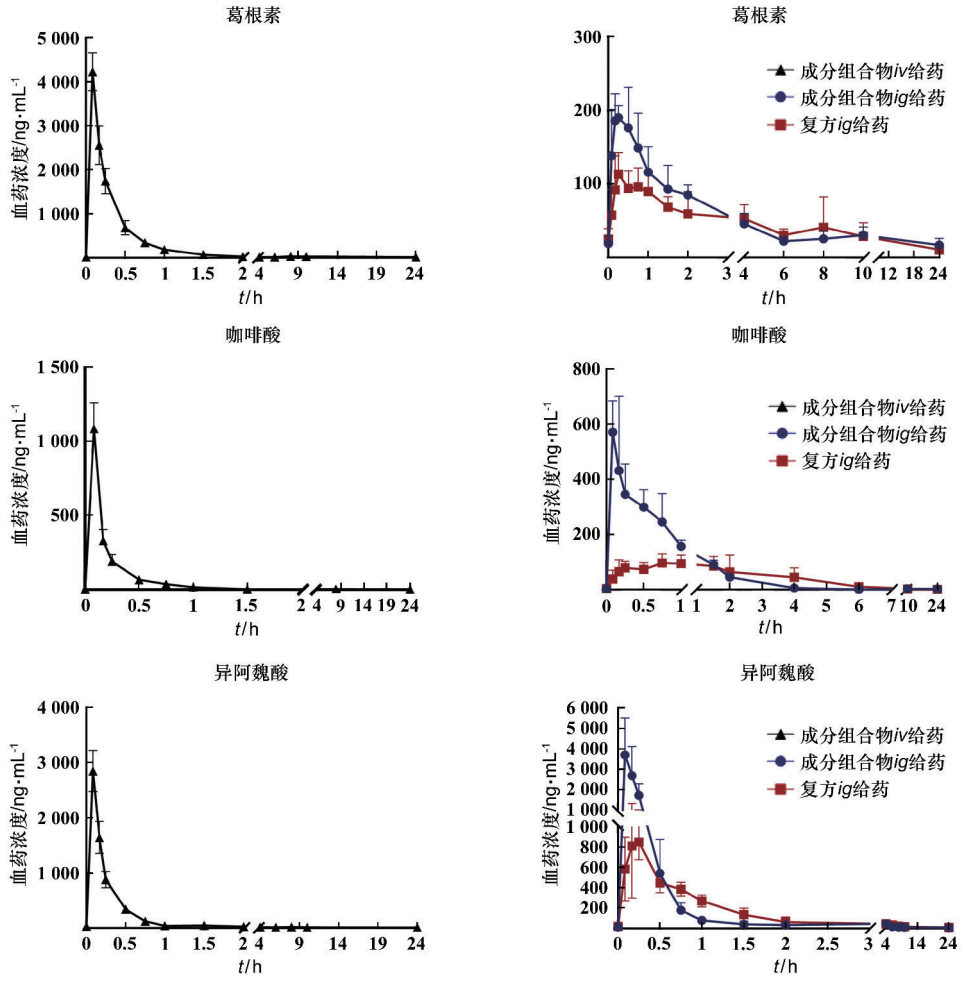


图 2　大鼠血浆中 5 种成分的血药浓度-时间曲线

表 5　银翘清热片及成分组合物中 5 种成分的药动学参数　　$\bar{x} \pm s$，$n = 6$

成分	给药方式	C_{max} /ng·mL^{-1}	T_{max}/h	AUC_{0-t} /ug·h·L^{-1}	$AUC_{0-\infty}$ /ug·h·L^{-1}	$t_{1/2}$/h	$MRT_{0-\infty}$/h	MRT_{0-t}/h
绿原酸	*iv* 给药	3 380 ± 185.04	0.083 ± 0	1 084.76 ± 73.14	1 091.66 ± 70.11	0.23 ± 0.05	0.22 ± 0.03	0.21 ± 0.03
	成分组合	133 ± 52.73	0.43 ± 0.28	187.37 ± 41.68	217.32 ± 43.97	1.79 ± 0.75	2.37 ± 0.76	1.54 ± 0.39
	复方给药	58.87 ± 19.94^{b}	0.51 ± 0.73^{d}	165.83 ± 19.74^{d}	198.78 ± 199.12^{d}	3.21 ± 0.69^{b}	4.69 ± 0.80^{c}	3.00 ± 0.31^{c}
阿魏酸	*iv* 给药	2 296.67 ± 269.49	0.083 ± 0	620.82 ± 84.25	623.18 ± 84.13	0.22 ± 0.21	0.12 ± 0.07	0.12 ± 0.06
	成分组合	786.83 ± 282.79	0.13 ± 0.07	197.89 ± 46.33	208.44 ± 50.48	0.53 ± 0.44	0.54 ± 0.43	0.41 ± 0.28
	复方给药	115.10 ± 30.98^{c}	0.24 ± 0.03^{b}	185.69 ± 54.37^{d}	206.84 ± 63.64^{d}	1.40 ± 0.81^{a}	2.39 ± 0.88^{c}	1.85 ± 0.70^{b}
异阿魏酸	*iv* 给药	2 851.67 ± 374.83	0.083 ± 0	897.09 ± 117.28	909.13 ± 115.20	0.46 ± 0.27	0.28 ± 0.10	0.25 ± 0.07
	成分组合	4 078.33 ± 1 434.82	0.13 ± 0.07	1 109.49 ± 240.89	1 233.29 ± 283.89	2.41 ± 2.49	0.66 ± 0.82	0.59 ± 0.48
	复方给药	996.83 ± 323.45^{c}	0.19 ± 0.04^{d}	918.94 ± 173.97^{d}	1 017.90 ± 219.37^{d}	2.89 ± 2.92^{d}	3.20 ± 1.74^{a}	1.64 ± 0.56^{b}
葛根素	*iv* 给药	4 231.67 ± 435.22	0.083 ± 0	1 479.99 ± 194.75	1 510.17 ± 202.32	0.23 ± 0.05	0.27 ± 0.04	0.25 ± 0.05
	成分组合	235.00 ± 74.57	0.43 ± 0.28	407.70 ± 74.06	504.07 ± 102.72	2.20 ± 1.57	2.98 ± 1.67	1.66 ± 0.38
	复方给药	122.12 ± 32.46^{b}	0.90 ± 1.52^{d}	357.52 ± 170.40^{d}	396.35 ± 202.10^{d}	2.83 ± 1.57^{d}	3.29 ± 2.17^{d}	2.63 ± 1.55^{d}
咖啡酸	*iv* 给药	1 085.83 ± 174.91	0.083 ± 0	330.01 ± 76.38	337.90 ± 75.54	0.20 ± 0.05	0.13 ± 0.04	0.11 ± 0.02
	成分组合	517.167 ± 240.82	0.17 ± 0.08	380.27 ± 98.27	412.51 ± 89.33	0.52 ± 0.12	0.87 ± 0.18	0.69 ± 0.08
	复方给药	129.35 ± 37.04^{b}	1.35 ± 0.49^{c}	320.97 ± 154.62^{d}	343.75 ± 172.08^{d}	1.23 ± 0.53^{b}	2.26 ± 0.90^{b}	1.95 ± 0.71^{b}

复方给药组与成分组合物给药组相比，a：$P < 0.05$；b：$P < 0.01$；c：$P < 0.001$；d：无显著性差异

表 6 绝对生物利用度与相对生物利用度结果

成分	绝对生物利用度/%（复方 *ig* 与 *iv*）	绝对生物利用度/%（成分组合 *ig* 与 *iv*）	相对生物利用度/%（复方 *ig* 与成分组合 *ig*）
绿原酸	0.84	0.95	88.50
葛根素	1.50	1.71	87.69
阿魏酸	32.97	35.14	93.84
异阿魏酸	45.17	54.53	82.83
咖啡酸	23.82	28.23	84.41

与成分组合物 *ig* 比较，复方给药后 5 种成分的 C_{max} 均显著降低（$P<0.01$），但 $AUC_{0-\infty}$ 均无显著差异。复方给药显著提升了绿原酸、阿魏酸、咖啡酸的 $t_{1/2}$（$P<0.05$），且除了葛根素以外的 4 个成分的平均滞留时间（mean residence time，MRT）均显著增大（$P<0.05$）。提示复方配伍后会使 5 种成分在大鼠体内的吸收减缓，消除变慢，停留时间延长。

进一步比较发现，银翘清热片给药后 5 种成分的血浆暴露量（$AUC_{0-\infty}$）从高到低依次为异阿魏酸 > 葛根素 > 咖啡酸 > 阿魏酸 > 绿原酸（见图 3），而各成分在复方中含量从高到低依次为葛根素 > 绿原酸 > 咖啡酸 > 异阿魏酸 > 阿魏酸。含量较低的异阿魏酸的血浆暴露量最高，含量最高的葛根素的血浆暴露量次之，含量较高的绿原酸的暴露量最低，提示制剂中各成分的绝对生物利用度差异较大，值得关注。

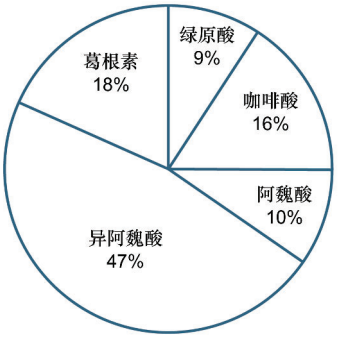


图 3 大鼠 *ig* 给予银翘清热片后 5 种成分的血浆暴露量比较

3 银翘清热片主要成分在大鼠体内的绝对和相对生物利用度研究

银翘清热片 *ig* 给予大鼠，其中绿原酸、葛根素、异阿魏酸、咖啡酸、阿魏酸的绝对生物利用度分别为 0.84%、1.50%、45.17%、23.82%、32.97%，相对生物利用度分别为 88.50%、87.69%、82.83%、84.41%、93.84%（见表 6）。提示复方中含量较高的绿原酸与葛根素的口服绝对生物利用度均较低。与组合物 *ig* 比较，复方中 5 种成分的相对生物利用度在 82% ~94% 之间，提示复方中其他成分对这 5 种成分的绝对生物利用度影响较小。各成分组合物的绝对生物利用度与复方的相近，进一步验证了该推测。

值得注意的是，口服绝对生物利用度较低的葛根素的血浆暴露量较高，仅次于异阿魏酸，是由于复方中的葛根素的含量较高，其进入血液的绝对量也相当可观。

讨 论

本次研究考察了甲醇沉淀法、乙腈沉淀法、乙酸乙酯萃取法、正丁醇萃取法、乙腈沉淀后乙酸乙酯萃取法、0.1% 甲酸甲醇溶液沉淀法、0.1% 甲酸乙腈溶液沉淀法等 7 种血浆前处理方法。整体而言，乙腈沉淀蛋白效果较优，各成分的提取回收率较适宜，加入 0.1% 甲酸后酚酸类成分提取回收率升高，各成分无明显的基质干扰，最终选择以 0.1% 甲酸乙腈溶液为沉淀剂对血浆样品进行蛋白沉淀处理。此外，本次实验比较了酮洛芬、对乙酰氨基酚、氯霉素、氢化可的松作为内标时的信号强度、分离效果和峰形，发现酮洛芬出峰时间靠后，响应高，易残留；对乙酰氨基酚响应低；氯霉素峰形较差；氢化可的松的保留时间较适宜，不会对 5 种成分的检测造成干扰，其浓度为 250 $ng\cdot mL^{-1}$ 时，在负离子模式下具有良好的信号强度，峰形好，因此选择氢化可的松作为内标。最终，通过系统的方法学验证，证明所建方法特异性好、灵敏度高、稳定性好、准确度高，适用于银翘清热片在大鼠血浆中药动学研究。

对于成分复杂的中药复方，主要活性成分的确定对其质量标准提升和临床合理应用具有重要意义，而活性成分通常是被吸收到血液中且能达到有效浓度的成分，需要通过药动学研究定量地描述中

药中各成分进入机体后的动态变化规律[12-13]，阐释给药后体内主要成分的分布位置、数量与时间之间的关系[14]。本研究结果表明大鼠 *ig* 给予银翘清热片后，5 种成分在体内吸收迅速，$t_{1/2}$均小于 4 h，提示银翘清热片在体内发挥药效快，不易造成体内蓄积。通过与成分组合物 *ig* 比较，提示复方配伍后会使 5 种成分在大鼠体内的吸收减缓，消除变慢，停留时间延长，但不影响体内暴露量，从而保证疗效充分发挥，减少高浓度引起的不良反应。

葛根素绝对生物利用度极低，与文献一致[15]，相对生物利用度又较高，表明葛根素的口服绝对生物利用度低是其自身理化性质造成，而不是复方配伍的结果。文献显示 200、400、600 mg·kg^{-1}给药剂量下绿原酸的绝对生物利用度为 34.28%、64.06%、85.20%[16]，可以预见更低剂量下（本次绿原酸的给药剂量为 18.144 mg·kg^{-1}）的绿原酸的绝对生物利用度将低于 34%，与本次实验结果一致。据文献报道，绿原酸在体内可通过Ⅰ相代谢水解为咖啡酸，再进一步经过Ⅰ相或Ⅱ相代谢生成 β-香豆酸、3-羟基苯丙酸、4-羟基苯甲酸、阿魏酸、肉桂酸等物质，提示绿原酸口服绝对生物利用度低的原因可能是因为代谢转化成阿魏酸与咖啡酸[17-18]。本研究也发现复方给药后阿魏酸存在二次吸收现象，而组合物不存在，推测复方配伍有利于其吸收，文献也证明阿魏酸在体内可通过胆汁分泌进入肠道而被重新吸收，形成肠肝循环，从而延长阿魏酸在体内的作用时间[19-20]，有利于药效的充分发挥，阐释了复方配伍的合理性。此外，本研究通过将复方制剂与组合物 *ig* 比较，揭示了复方中其他成分对这 5 种成分的绝对生物利用度影响较小，为后续类似的复方对主要成分体内吸收代谢影响研究提供思路。

综上所述，本研究建立了灵敏、准确的同时测定大鼠血浆中 5 种成分含量的方法，揭示了银翘清热片中 5 种主要活性成分的药动学特征与生物利用度，为后续药效物质的挖掘、质量标准的提升与临床合理应用提供科学依据。

[参 考 文 献]

[1] 王伟. 银翘清热片的质量标准提升与稳定性研究[D]. 南京：南京中医药大学，2015.
[2] 张洁玉，周凌，张瑜. 银翘败毒片治疗感冒（外感风热证）有效性和安全性Ⅱ期临床试验报道[J]. 中医药学报，2015，43(3)：72-75.
[3] 黄雅菊，张业清，孙航成，等. 银翘败毒片治疗感冒（外感风热证）60 例临床观察[J]. 中国现代药物应用，2017，11(15)：132-133.
[4] 吴圣贤，樊钦华，苏文全，等. 银翘清热片临床疗效观察[J]. 生物医学转化，2022，3(3)：82-92.
[5] 黄佳奇，谭影影，陈美琳，等. 基于网络药理学和分子对接技术的银翘清热片治疗上呼吸道感染机制研究[J]. 中国药师，2022，25(10)：1745-1752.
[6] 蔡泽荣，胡玉梅，刘文君，等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 和 GC-MS 法分析银翘清热片化学成分[J]. 南京中医药大学学报，2025，26(6)：1198-1212.
[7] 孟晓伟，郭风梅，王倩倩，等. 葛根素的药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志，2025，50(11)：2954-2968.
[8] 龚兴成，刘文静，曹丽波，等. DI-MS/MSALL 法快速定性分析金银花的化学成分[J]. 中国中药杂志，2021，46(9)：2220-2228.
[9] 刘松涛，杨琳，王松，等. 金银花的化学成分研究[J]. 中医药信息，2020，37(5)：18-21.
[10] 张家燕. 中药金银花的药用成分及药理作用分析[J]. 中国医药指南，2019，17(17)：177-178.
[11] 任菲菲，张静. 波长转换法测定威灵仙中异阿魏酸和灵仙新苷含量[J]. 中国医药科学，2025，15(1)：58-61.
[12] 田甜，李园园，吴家胜，等. 小鼠体内金芪降糖胶囊多成分药代动力学研究[J]. 药学学报，2025，60(4)：1084-1092.
[13] 巩仔鹏，林朝展，韩立炜. 从国家自然科学基金资助项目浅析中药药代动力学研究现状[J]. 中国中药杂志，2021，46(4)：1010-1016.
[14] 田媛，陈茜，雷玲，等. 疾病对中药药代动力学影响的研究进展[J]. 中药药理与临床，2026，42(2)：152-160.
[15] 叶盛航，朱卫丰，臧振中，等. 葛根素-大豆苷元包合物纳米晶的制备及性能研究[J]. 中国药学杂志，2024，59(22)：2159-2168.
[16] 任静，蒋学华，邓盛齐，等. 绿原酸大鼠口服吸收绝对生物利用度研究[J]. 中国抗生素杂志，2012，37(11)：847-850.
[17] 骆成尧. 绿原酸与咖啡酸体外代谢机制及相互作用研究[D]. 南昌：南昌大学，2012.
[18] 刘晗，李春玉，王显鹤，等. 绿原酸抗纤维化研究进展[J]. 广东化工，2025，52(8)：81-83.
[19] 张宇，李家明，彭丹，等. 香芍散结口服液 3 种入血成分在乳腺增生症模型大鼠体内的药动学研究[J]. 中国药房，2025，36(6)：680-685.
[20] LI X，SHI GB. Therapeutic effects and mechanism of ferulic acid and icariin in mammary gland hyperplasia model rats via regulation of the ERK pathway[J]. *Ann Transl Med*，2021，9(8)：666.

编辑：蒋欣欣/接受日期：2025-11-13