

## 金振口服液的 2 种成分在大鼠体内的药动学

高霞<sup>1,2</sup>, 王善丽<sup>1,2,3</sup>, 王佳佳<sup>1,2</sup>, 高惠芳<sup>1,2</sup>, 钱梦雨<sup>1,2</sup>, 童孝宇<sup>1,2</sup>, 陈夏霖<sup>1,2</sup>, 张全昌<sup>1,2</sup>,  
曹亮<sup>1,2</sup>, 王振中<sup>1,2</sup>, 肖伟<sup>1,2</sup>

(1 江苏康缘药业股份有限公司, 连云港 222001; 2 中药制药过程新技术国家重点实验室, 连云港 222001;  
3 中国药科大学, 南京 211199)

**[摘要]** **目的:** 评估金振口服液单次和多次服用后药动学特征和吸收代谢差异。**方法:** 运用超高效液相色谱-三重四级杆质谱联用(UPLC-TSQ-MS)技术, 建立同时定量大鼠血浆中黄芩苷和汉黄芩苷的分析方法。将健康大鼠分别按 3.228, 6.456, 12.912 g 生药量·kg<sup>-1</sup> 单次灌胃(ig)和按 6.456 g 生药量·kg<sup>-1</sup> 多次 ig 金振口服液, 测定不同时间血浆中待测成分含量, 运用非房室模型计算药动学参数。**结果:** 血浆样品中 2 种成分的线性关系良好( $r > 0.995$ ), 提取回收率和基质效应的 RSD 均 < 15%, 批内、批间的精密度和准确度以及稳定性均符合生物样品分析要求。大鼠单次给药后, 黄芩苷和汉黄芩苷的 AUC<sub>0-*t*</sub> 均与剂量呈良好的正相关性, 且不同剂量下  $t_{1/2\alpha}$  和清除率(CL<sub>z</sub>/F)无显著变化; 与单次给药相比, 多次给药后大鼠的吸收代谢过程基本相同、AUC<sub>0-*t*</sub> 和  $t_{1/2\alpha}$  差异无统计学意义。**结论:** 本研究建立了稳定可靠的黄芩苷和汉黄芩苷 UPLC-TSQ-MS 定量方法, 在 3.228 ~ 12.912 g 生药量·kg<sup>-1</sup> 范围内金振口服液中 2 种成分在体内呈现线性动力学的特征, 多次给药后无蓄积现象, 揭示该制剂临床剂量的合理性。

**[关键词]** 金振口服液; 药动学; 超高效液相色谱-三重四级杆质谱联用; 黄芩苷; 汉黄芩苷

**[中图分类号]** R963 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)05-0522-09

## Pharmacokinetics of two components of Jinzhen oral liquid in rats

GAO Xia<sup>1,2</sup>, WANG Shan-li<sup>1,2,3</sup>, WANG Jia-jia<sup>1,2</sup>, GAO Hui-fang<sup>1,2</sup>, QIAN Meng-yu<sup>1,2</sup>, TONG Xiao-yu<sup>1,2</sup>,  
CHEN Xia-lin<sup>1,2</sup>, ZHANG Quan-chang<sup>1,2</sup>, CAO Liang<sup>1,2</sup>, WANG Zhen-zhong<sup>1,2</sup>, XIAO Wei<sup>1,2</sup>

(1 Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China; 2 State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China; 3 China Pharmaceutical University, Nanjing 211199, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the pharmacokinetic characteristics of Jinzhen oral liquid and compare the difference of the absorption and metabolism after single and multiple administrations in rats. **Methods:** An ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple-stage quadrupole mass spectrometer (UPLC-TSQ-MS) was applied to established the method for simultaneous determination of baicalin and wogonoside in rat plasma. Healthy rats were administered a single dose (3.228, 6.456, and 12.912 g·kg<sup>-1</sup>) and multiple dose (6.456 g·kg<sup>-1</sup>) of Jinzhen oral liquid (crude drug) by oral gavage. The content of target components in plasma at different time points was determined, and the pharmacokinetic parameters were calculated using the non-compartmental model. **Results:** The two components in the plasma sample have good linear relation ( $r > 0.99$ ). RSDs of their extraction

**[基金项目]** 江苏省工信厅 2020 年度工业和信息产业转型升级专项资金项目: 多组分中药研究关键技术

**[作者简介]** 高霞, 女, 硕士, 主要从事药物分析、药动力学研究。E-mail: gaoxia0218@163.com。

**[通讯作者]** 肖伟, 男, 博士生导师, 院士, 主要从事中药新剂型的研究与开发。联系电话: (0518) 81522367, E-mail: kanionlunwen@163.com。

recovery rate and matrix effect are both  $< 15\%$ , the intra- and inter-batch precision and accuracy, and stability meet the requirements of biological sample analysis. After single administration of Jinzhen oral liquid, the areas under the concentration-time curve  $AUC_{(0-t)}$  of baicalin and wogonoside show a good positive correlation with dose ( $R^2 > 0.9$ ), and their  $t_{1/2z}$  and  $CL_z/F$  have no significant difference at different doses. Compared with a single administration, their absorption and metabolism process are basically the same, and their  $AUC_{(0-t)}$  and  $t_{1/2z}$  have no significant difference after multiple administration. **Conclusion:** A stable and reliable UPLC-TSQ-MS quantitative method for baicalin and wogonoside was established. And two components of Jinzhen oral liquid show linear dynamics characteristics in rats between 3.228 and 12.912  $g \cdot kg^{-1}$  (crude drug), and there is no accumulation after multiple administrations, revealing the rationality of the clinical dosage of the preparation.

**[Key words]** Jinzhen oral liquid; pharmacokinetics; UPLC-TSQ-MS; baicalin; wogonin

金振口服液源于民间儿科经验方羚羊清肺散,是中药处方优化制剂,组方为山羊角、平贝母、大黄、黄芩、青礞石、石膏、人工牛黄、甘草,具有清热解毒、祛痰止咳的功效。临床用于治疗小儿支气管炎、支气管肺炎、上呼吸道感染等以痰热咳嗽为主症的患者<sup>[1-3]</sup>。现代药理研究表明其具有较好的解热<sup>[4]</sup>、抗炎<sup>[5-6]</sup>、镇咳<sup>[7]</sup>以及抗病毒作用<sup>[8-10]</sup>。

现行标准对制剂中的黄芩苷以高效液相色谱进行了含量控制<sup>[11]</sup>。为了更全面控制金振口服液质量,深入分析其功效成分群,前期研究分别建立了制剂中黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸等 13 种成分和 29 种氨基酸同时定量的方法<sup>[12-13]</sup>;系统研究了化学成分谱和体内代谢物谱,表明入血的成分主要包括黄芩苷、汉黄芩苷、大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、甘草酸、甘草苷、贝母素甲、贝母素乙等<sup>[14]</sup>;其中含量较高且可吸收入血的成分黄芩苷、汉黄芩苷、甘草酸均具有良好的解热、抗炎、抗病毒作用<sup>[15-18]</sup>,是其主要活性成分。

中药口服制剂给药后,经消化道、肠道菌群作用,生成一种由中药固有成分及其代谢产物组成的混合物,通过血液运输到各个器官组织或靶点。其中吸收入血并保持一定的血药浓度是发挥药效的关键,因此有必要系统研究该制剂的药动学特征。本实验结合前期研究结果,采用超高效液相色谱-三重四级杆质谱联用(UPLC-TSQ-MS)技术从制剂的 17 种主要成分中筛选出黄芩苷和汉黄芩苷 2 个指标,依据《中华人民共和国药典》2020 年版中生物样品定量分析指导原则进行系统的方法学验证,建立稳定可靠的定量方法,研究制剂中这 2 种成分在体内的动态变化规律以及多次服药后体内蓄积情况,进一步阐明金振口服液的药效物质基础,为其质量控

制指标的选择提供数据支撑,为其临床合理应用提供依据。

## 材料和方法

### 1 仪器与试剂

LC-30AD 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);AB API4000 + 型质谱仪(美国 AB 公司);HSC-24A 型氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司);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);XS205DU 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);KF10002 型电子分析天平(浙江凯丰集团有限公司);-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)。

金振口服液(江苏康缘药业股份有限公司,批号:191291,规格:10 mL·支<sup>-1</sup>,其中含黄芩苷 0.68 mg·mL<sup>-1</sup>、汉黄芩苷 0.13 mg·mL<sup>-1</sup>,根据处方折算成生药量为 0.269 g·mL<sup>-1</sup>);黄芩苷(中国食品药品检定研究院,批号:110715-2016191,规格:40 mg·支<sup>-1</sup>,纯度:93.5%);汉黄芩苷(中国食品药品检定研究院,批号:112002-201702,规格:20 mg·支<sup>-1</sup>,纯度:98.5%);氢化可的松(中国食品药品检定研究院,批号:100152-201707,规格:50 mg·支<sup>-1</sup>,纯度:99.2%);甲酸、乙酸、甲醇、乙腈均为色谱纯;盐酸为分析纯;水为纯化水。

### 2 动物

健康 SD 大鼠 32 只,雌雄各半,体重 180~220 g,由浙江省医学科学院提供,生产许可证号:SCXK(浙)2019-0002。饲养环境:室温(23±2)℃,相对湿度(60±5)%,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实验动物伦理委员会的规章和制度。

### 3 溶液的配制

**3.1 对照品储备液配制** 取汉黄芩苷对照品适量,精密称定,分别置于 100 mL 棕色容量瓶中,加入甲醇定容至刻度,超声使其溶解后,配制成质量浓度为  $86.9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的汉黄芩苷储备液。取黄芩苷对照品适量,精密称定,置于 100 mL 棕色容量瓶中,加入 pH 3~5 的甲醇溶液(盐酸调节)定容至刻度,超声使其溶解后,配制成质量浓度为  $79.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的黄芩苷储备液。

**3.2 混合对照品溶液配制** 分别精密吸取黄芩苷、汉黄芩苷储备液适量,用 pH 3~5 的 50% 甲醇溶液稀释成系列混合对照品溶液 HBM-1~HBM-9。HBM-1~HBM-9 中黄芩苷和汉黄芩苷质量浓度依次为 20 000, 10 000, 5 000, 3 750, 2 500, 1 250, 625, 312.5, 156.2  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。同时,分别精密吸取另外配制的黄芩苷、汉黄芩苷储备液适量,用 pH 3~5 的 50% 甲醇溶液稀释成不同质量浓度混合对照品溶液 QCHM, QCMM, QCLM, LLOQM, 黄芩苷和汉黄芩苷质量浓度依次为 15 000, 2 500, 312.5, 156.2  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

**3.3 内标溶液** 取氢化可的松对照品适量,精密称定,置于 10 mL 棕色容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,配制成质量浓度为  $668 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的储备液。精密吸取氢化可的松储备液适量,用甲醇稀释至  $400 \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 现配现用。

### 4 UPLC-TSQ-MS 分析

**4.1 色谱条件** 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus  $\text{C}_{18}$  柱(50 mm  $\times$  3.0 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ); 柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 流速 0.6  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 进样量 3  $\mu\text{L}$ ; 流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B); 梯度洗脱(0~4 min, 25% B; 4.0~4.5 min, 25%~55% B; 4.5~7.0 min, 55% B; 7.0~7.5 min, 55%~90% B; 7.5~8.0 min, 90%~25% B; 8.0~9.0 min, 25% B)。

**4.2 质谱条件** 电喷雾离子源, 负离子模式检测; 多反应监测模式扫描; 碰撞气 8 psi; 气帘气 20 psi; 温度 500  $^{\circ}\text{C}$ ; 离子化电压 -4 500 V; 雾化气 40 psi; 辅助气 60 psi; 黄芩苷、汉黄芩苷及内标用于定量分析的离子对分别为  $m/z$  445.1  $\rightarrow$  268.9,  $m/z$  459.1  $\rightarrow$  283.3,  $m/z$  360.8  $\rightarrow$  331.0; 碰撞能量分别为 -23, -22, -15 V; 锥孔电压依次为 -90, -92, -65 V。

### 5 血浆样品的处理

取大鼠血浆样品 100  $\mu\text{L}$ , 加入 10  $\mu\text{L}$  的 4% 乙酸

溶液(含 1% 抗坏血酸), 加入 400  $\mu\text{L}$  含  $400 \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  内标的甲醇溶液, 涡旋混匀,  $14\ 000 \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清液, 氮气吹干, 残留物用 100  $\mu\text{L}$  的 50% 甲醇溶液复溶,  $14\ 000 \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清液, 待测。

### 6 方法学考察<sup>[16]</sup>

**6.1 特异性考察** 取 6 份不同来源的大鼠空白血浆各 90  $\mu\text{L}$ , 分别加入 10  $\mu\text{L}$  pH 3~5 的 50% 甲醇和 10  $\mu\text{L}$  4% 乙酸溶液(含 1% 抗坏血酸), 再加入 400  $\mu\text{L}$  甲醇, 其余按“5”项下方法操作, 得到大鼠空白血浆样品。

取大鼠空白血浆 90  $\mu\text{L}$ , 加入 10  $\mu\text{L}$  混合对照品溶液 LLOQM, 其余按“5”项下方法操作, 得到定量下限样品 LLOQ(黄芩苷、汉黄芩苷质量浓度分别为 15.62, 15.62  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 平行制备 6 份。

取给药后大鼠血浆 100  $\mu\text{L}$ , 其余按“5”项下方法操作, 得到给药后血浆样品。按“4”项下检测条件进样分析。

**6.2 标准曲线与线性范围考察** 取 90  $\mu\text{L}$  空白血浆若干份, 分别依次加入 10  $\mu\text{L}$  系列混合对照品溶液(HBM-1~HBM-9), 其余按“5”项下方法操作, 得到校正标准样品。以待测物的质量浓度( $C$ )为横坐标, 待测物与内标的峰面积比值为纵坐标( $y$ ), 采用加权最小二乘法( $1/C^2$ )进行线性回归分析, 即得标准曲线。

**6.3 定量下限考察** 取空白血浆 90  $\mu\text{L}$ , 加入 10  $\mu\text{L}$  混合对照品溶液 LLOQM, 配制成黄芩苷、汉黄芩苷终浓度分为 15.62, 15.62  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的血浆样品, 平行制备 6 份, 其余按“5”项下方法操作, 进样分析。由当日随行标准曲线计算血浆样品中待测物的质量浓度, 计算准确度和 RSD。

**6.4 准确度和精密度考察** 取 90  $\mu\text{L}$  空白血浆样品若干份, 加入 10  $\mu\text{L}$  混合对照品溶液(QCHM, QCMM, QCLM, LLOQM), 其余按“5”项下方法操作, 制备黄芩苷、汉黄芩苷的定量下限(15.62, 15.62  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、低浓度(31.25, 31.25  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、中浓度(250, 250  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )以及高浓度(1 500, 1 500  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )的质控样品, 每一浓度水平平行制备 6 份, 连续测定 3 个分析批, 每个分析批间至少间隔 12 h。根据每批随行标准曲线, 计算血浆样品中待测物的质量浓度, 计算批内和批间的精密度和准确度。

**6.5 提取回收率与基质效应考察** 取空白血浆样品若干份, 按以下 3 种方式处理: 第 1 组, 取空白血

浆 90  $\mu\text{L}$ , 加入 10  $\mu\text{L}$  混合对照品溶液 (QCHM, QCMM, QCLM), 随后按“5”项下方法操作, 制备黄芩苷和汉黄芩苷的低、中、高浓度的血浆样品; 第 2 组, 取不同来源空白血浆 90  $\mu\text{L}$ , 加入 10  $\mu\text{L}$  4% 乙酸溶液 (含 1% 抗坏血酸), 加入 400  $\mu\text{L}$  甲醇, 涡旋混匀, 其余按“5”项下方法操作至挥干, 然后加入 10  $\mu\text{L}$  第 1 组中混合对照品溶液, 10  $\mu\text{L}$  超纯水, 80  $\mu\text{L}$  含 2 000  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  内标的 50% 甲醇溶液; 第 3 组, 取 10  $\mu\text{L}$  第 1 组中混合对照品溶液, 加入 10  $\mu\text{L}$  4% 乙酸溶液 (含 1% 抗坏血酸), 80  $\mu\text{L}$  含 2 000  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  内标的 50% 甲醇溶液。3 组中每一浓度水平平均平行制备 6 份样品。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, 即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, 即为待测物的基质效应。

**6.6 稳定性考察** 取 90  $\mu\text{L}$  空白大鼠血浆若干份, 分别加入 10  $\mu\text{L}$  混合对照品溶液 (QCLM, QCHM), 振荡 30 s 混匀, 配制成低、高浓度质控样品。随后将它们分别以不同的方式放置, 如室温放置 4 h、冷冻 ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) - 解冻 (室温) 3 次循环后, 按“5”项下方法操作, 进样分析。同时, 另设一组低、高浓度质控样品, 先按“5”项下方法操作后转移至进样瓶中, 再置于进样盘 (进样盘温度设定为  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 中搁置 24 h 后进样分析。每个条件下均根据检测当日随行标准曲线, 计算大鼠血浆中待测物的质量浓度。分别配制待测物储备液、混合对照品溶液 (低、高浓度) 以及内标储备液的新鲜溶液。黄芩苷和汉黄芩苷长期存放和新鲜配制的储备液均稀释至 1 500  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  后进样分析, 内标长期存放和新鲜配制的储备液均稀释至 2 000.00  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  后进样分析。长期存放和新鲜配制的工作液均稀释 10 倍后直接进样分析。

## 7 金振口服液单次给药后在大鼠体内药动学研究

取健康大鼠 24 只, 随机分为 3 组 (低、中、高浓度剂量组, 大鼠给药剂量分别为 3.228, 6.456, 12.912  $\text{g}$  生药量  $\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 每组 8 只, 雌雄各半。实验前禁食 12 h, 不禁水。各组大鼠分别灌胃 (*ig*) 给予

金振口服液, 于给药前以及给药后 10, 20, 30, 45 min 和 1, 2, 4, 6, 8, 10, 11, 24, 30 h 于大鼠眼眶静脉采血 300  $\mu\text{L}$ , 置于肝素化离心管中, 8 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$   $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  离心 5 min 收集上清液, 即得血浆, 按“5”项下方法操作, 进样分析。每批血浆样品测定时均随行标准曲线和 2 份低、中、高浓度质控样品, 当两者均达到生物样品定量分析的要求 (校正标准样品测定回算浓度一般应在标示值的  $\pm 15\%$  范围内、定量下限应在  $\pm 20\%$  范围内, 且不少于 6 个校正标准样品, 至少 75% 标准样品符合这些标准; 质控样品的准确度值应该在标示值的  $\pm 15\%$  范围内, 至少 67% 质控样品, 且每一浓度水平至少 50% 样品应符合这一标准), 接受此分析批, 否则重新提取和分析该分析批。

## 8 金振口服液多次给药后在大鼠体内药动学研究

取健康 SD 大鼠 8 只, 雌雄各半, 连续 7 d, *ig* 给药 (每天上午 9:00), 给药量为 6.456  $\text{g}$  生药量  $\cdot\text{kg}^{-1}$ , 在 d 4, d 5, d 6 给药后 24 h 时自眼眶静脉取血 300  $\mu\text{L}$ , 在 d 7 时, 分别于给药后 10, 20, 30, 45 min 和 1, 2, 4, 6, 8, 10, 11, 24, 30 h 于大鼠眼眶静脉采血 300  $\mu\text{L}$ , 置于肝素化的离心管中, 以 8 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 取上层血浆, 按“5”项下方法操作, 进样分析。

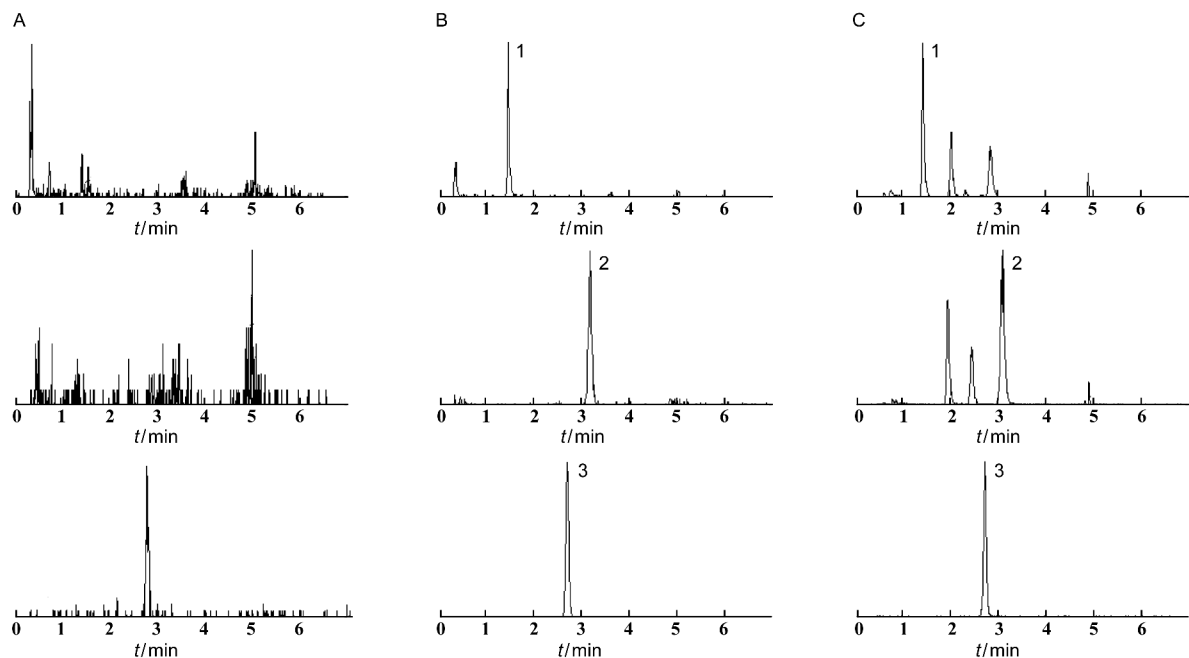
## 9 数据处理

利用 GraphPad 6.01 绘制血浆中药物浓度-时间曲线, 利用 DAS 3.2.8 软件计算药动学参数, 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。运用 Excel 对大鼠单次给药剂量与  $\text{AUC}_{0-t}$ ,  $C_{\text{max}}$  进行线性回归分析。运用 SPSS 20.0 进行统计学分析, 两组比较采用 *t* 检验和非参数检验, 多组比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示具有统计学意义。

## 结 果

### 1 分析方法的确证<sup>[19]</sup>

**1.1 特异性** 在本实验条件下, 黄芩苷、汉黄芩苷、内标的保留时间分别为 1.48, 3.18, 2.71 min, 6 份不同来源的空白血浆中待测物的干扰峰响应均低于 LLOQ 的 20%, 内标的干扰峰响应低于 LLOQ 的 5%, 即内标和对照品实现完全分离, 血浆中内源性物质和代谢物不干扰待测物的测定。表明该方法专属性良好, 见图 1。



A:空白血浆;B:空白血浆+对照品;C:给药后血浆样品;1:黄芩苷;2:汉黄芩苷;3:内标

图1 黄芩苷、汉黄芩苷在大鼠血浆样品中专属性谱图

**1.2 标准曲线与线性范围** 黄芩苷、汉黄芩苷的线性关系良好,分别为  $y = 0.0019C + 0.00565$  ( $r = 0.9965$ ),  $y = 0.0011C + 0.00247$  ( $r = 0.9953$ ), 线性范围分别为  $15.62 \sim 2000.00$ ,  $15.62 \sim 2000.00$   $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 定量下限分别为  $15.62$ ,  $15.62$   $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**1.3 定量下限** 黄芩苷、汉黄芩苷的精密度 RSD 分别为  $10.6\%$ ,  $14.0\%$ , 准确度分别为  $(91.8 \pm 9.9)\%$ ,  $(88.7 \pm 12.5)\%$ , 均符合生物样品的检测

要求。

**1.4 准确度和精密度** 低、中、高浓度质控样品及定量下限样品中黄芩苷、汉黄芩苷的批内精密度 RSD 在  $1.8\% \sim 6.0\%$ , 批间精密度 RSD 在  $7.3\% \sim 11.5\%$ , 均  $< 15\%$ ; 批内平均准确度在  $88.3\% \sim 102.1\%$ , 批间平均准确度在  $90.2\% \sim 102.4\%$ , 均在标示值的  $\pm 15\%$  内, 见表 1。提示该方法重复性好且准确, 符合生物样品的检测要求。

表1 2种待测物在大鼠血浆中的批内和批间的准确度和精密度

待测物	质量浓度 $/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	精密度 RSD/%		准确度/%	
		批内 ( $n=6$ )	批间 ( $n=18$ )	批内 ( $n=6$ )	批间 ( $n=18$ )
黄芩苷	15.62	2.8	10.9	$98.3 \pm 2.8$	$99.6 \pm 10.9$
	31.25	4.7	11.5	$101.8 \pm 4.8$	$99.1 \pm 11.3$
	250.00	5.5	8.1	$102.1 \pm 5.6$	$102.4 \pm 8.4$
	1500.00	4.0	8.7	$93.8 \pm 3.8$	$96.0 \pm 8.4$
汉黄芩苷	15.62	6.0	10.9	$96.3 \pm 6.0$	$92.8 \pm 10.2$
	31.25	5.1	8.4	$88.3 \pm 4.6$	$90.2 \pm 7.6$
	250.00	5.1	7.9	$100.9 \pm 5.2$	$94.6 \pm 7.5$
	1500.00	3.4	7.3	$96.4 \pm 3.2$	$98.8 \pm 7.3$

**1.5 提取回收率与基质效应** 2种待测物在高、中、低浓度下的平均提取回收率在  $70.35\% \sim 80.58\%$ , RSD 在  $2.99\% \sim 6.32\%$ ; 基质效应在  $1.04 \sim 1.19$ ,

RSD 在  $1.87\% \sim 7.39\%$ , 见表 2。表明该方法中黄芩苷、汉黄芩苷具有稳定的提取回收率和基质效应, 符合生物样品的检测要求。

表 2 2 种待测物在大鼠血浆中的基质效应和提取回收率

n = 6

待测物	质量浓度 /ng·mL <sup>-1</sup>	基质效应		提取回收率	
		$\bar{x} \pm s$	RSD/%	$\bar{x} \pm s$	RSD/%
黄芩苷	31.25	1.09 ± 0.08	7.39	70.35 ± 4.08	5.81
	250	1.04 ± 0.03	3.33	74.78 ± 2.48	3.31
	1 500	1.04 ± 0.03	2.98	74.11 ± 2.29	3.08
汉黄芩苷	31.25	1.19 ± 0.09	7.39	78.37 ± 4.95	6.32
	250	1.13 ± 0.03	2.60	80.58 ± 2.97	3.68
	1 500	1.10 ± 0.02	1.87	78.62 ± 2.35	2.99

**1.6 稳定性** 含黄芩苷、汉黄芩苷的大鼠血浆样品室温放置 2 h 稳定,平均准确度介于 100.8% ~ 108.4%,RSD 介于 4.7% ~ 6.9%;4 °C 放置 24 h 稳定,平均准确度介于 93.5% ~ 105.8%,RSD 介于 7.4% ~ 11.4%;经过 3 个周期(-80 °C 和室温)的

冻融循环稳定,平均准确度介于 95.1% ~ 109.0%,RSD 介于 2.5% ~ 8.2%,见表 3。内标和待测物的储备液和工作液 4 °C 存放 30 d 仍可保持稳定,变化百分比介于 -10.3% ~ 2.4%。表明 2 种待测物具有足够的稳定性,满足生物样品的检测要求。

表 3 2 种待测物的稳定性

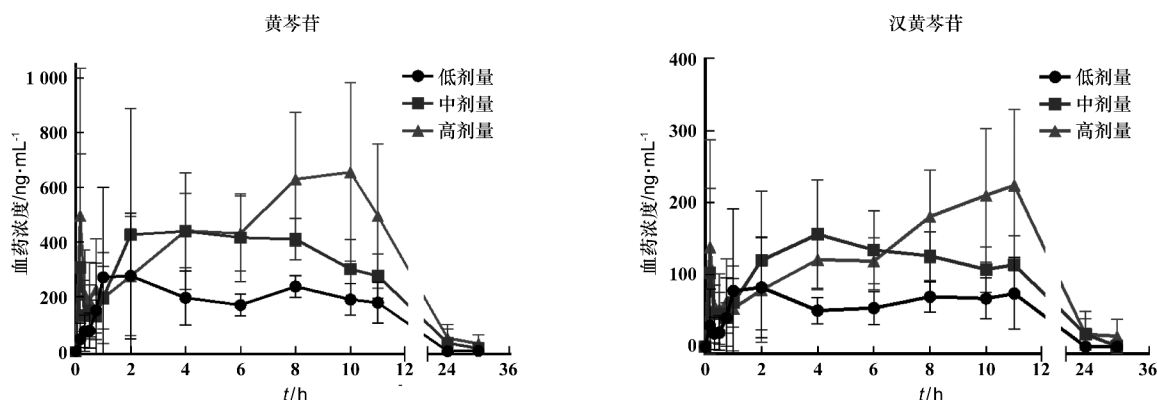
 $\bar{x} \pm s, n = 6$ 

待测物	质量浓度 /ng·mL <sup>-1</sup>	室温放置 2 h		4 °C 放置 24 h		反复冻融 3 次	
		准确度/%	RSD/%	准确度/%	RSD/%	准确度/%	RSD/%
黄芩苷	31.25	108.4 ± 5.1	4.7	93.5 ± 9.5	10.2	109.0 ± 7.2	6.5
	1 500	100.8 ± 5	4.7	102.9 ± 11.8	11.4	95.1 ± 2.3	2.5
汉黄芩苷	31.25	103.4 ± 7.2	6.9	91.6 ± 7.9	8.7	107.2 ± 8.6	8.2
	1 500	107.2 ± 5	4.8	105.8 ± 8.1	7.4	102.0 ± 4.4	4.2

## 2 金振口服液单次给药后在大鼠体内药动学研究

大鼠血浆中各成分的平均浓度-时间曲线见图 2,黄芩苷、汉黄芩苷均出现前低后高的双峰现象,

低、中剂量组中第 2 次达峰时间为 5 ~ 6 h,高剂量组中第 2 次达峰时间为 8 ~ 9 h。

图 2 大鼠给予 3 种剂量金振口服液后血浆中各成分平均浓度-时间曲线( $\bar{x} \pm s, n = 6 \sim 8$ )

药动学参数见表 4,2 种待测物的  $AUC_{0-1}$  随着剂量增大逐渐增加,不同剂量下  $t_{1/2z}$ ,  $CL_z/F$  及  $V_z/F$

无显著差异。

表4 金振口服液经大鼠单次给药后血浆中各成分的药动学参数  $\bar{x} \pm s, n = 6 \sim 8$ 

分析物	参数	低剂量	中剂量	高剂量
黄芩苷	$AUC_{0-t}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	3 622.8 ± 1 433.4	6 691.3 ± 1 627.5	10 101.5 ± 4 134.4
	$AUC_{0-\infty}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	3 634.3 ± 1 434.6	6 696.1 ± 1 631.1	10 104.2 ± 4 137.5
	$C_{\text{max}}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	382.4 ± 264.9	732.4 ± 428.9	859.2 ± 460.1
	$T_{\text{max}}/\text{h}$	5.1 ± 3.2	5.2 ± 4.1	7.9 ± 4.0
	$t_{1/2z}/\text{h}$	2.4 ± 2.7	2.9 ± 1.8	2.9 ± 1.1
	$CL_z/F/L\cdot\text{h}\cdot\text{kg}^{-1}$	2.6 ± 0.8	2.6 ± 0.6	3.8 ± 1.5
	$V_z/F/L\cdot\text{kg}^{-1}$	8.1 ± 8.5	11.1 ± 6.4	15.0 ± 7.6
汉黄芩苷	$AUC_{0-t}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	1 158.1 ± 537.9	2 441.1 ± 742.9	3 274.4 ± 1 426.1
	$AUC_{0-\infty}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	1 158.1 ± 537.9	2 441.3 ± 743.2	3 274.7 ± 1 426.8
	$C_{\text{max}}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	135.4 ± 94.9	217.9 ± 96.6	257.0 ± 108.6
	$T_{\text{max}}/\text{h}$	6.5 ± 4.7	5.3 ± 4.3	9.2 ± 4.0
	$t_{1/2z}/\text{h}$	1.1 ± 0.1	2.1 ± 1.1	1.9 ± 1.0
	$CL_z/F/L\cdot\text{h}\cdot\text{kg}^{-1}$	1.6 ± 0.8	1.4 ± 0.4	2.1 ± 0.8
	$V_z/F/L\cdot\text{kg}^{-1}$	2.7 ± 1.5	4.0 ± 2.1	5.1 ± 2.0

给药剂量与  $AUC_{0-t}, C_{\text{max}}$  的线性回归分析结果见表5, 黄芩苷和汉黄芩苷的  $AUC_{0-t}$  与给药剂量呈良好的线性关系 ( $R^2 > 0.9$ ), 表明在 3.228 ~

12.912 g 生药量  $\cdot\text{kg}^{-1}$  时, 黄芩苷、汉黄芩苷在大鼠体内呈线性动力学特征。

表5  $AUC_{0-t}, C_{\text{max}}$  与给药剂量的相关性

化合物	$AUC_{0-t}$		$C_{\text{max}}$	
	线性关系	$R^2$	线性关系	$R^2$
黄芩苷	$y = 250.93x + 1\,924.5$	0.975	$y = 17.613x + 313.44$	0.808
汉黄芩苷	$y = 434.64x + 742.42$	0.907	$y = 24.576x + 115.84$	0.855

### 3 金振口服液多次给药后在大鼠体内药动学研究

大鼠血浆中黄芩苷、汉黄芩苷的平均浓度-时间曲线见图3, 药动学参数见表6, 并采用 SPSS 20.0 中  $t$  检验和非参数检验对单次和多次给药后药动学参数进行统计分析, 以  $P < 0.05$  表示具有统计学意义。由图3可知, 大鼠单次给药和多次给药后黄芩

苷、汉黄芩苷的吸收代谢规律基本一致。表6结果显示, 在一个完整的采样周期内(给药后 0 ~ 30 h), 黄芩苷和汉黄芩苷的  $AUC_{0-t}$  和  $t_{1/2z}$  与单次给药相比无显著性差异, 表明它们在体内无蓄积, 提示在所选择的剂量下用药安全。

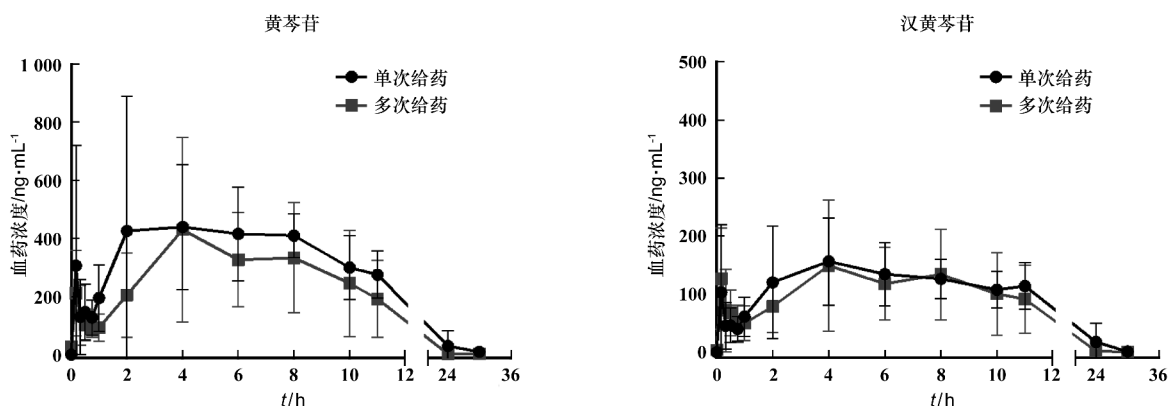
图3 大鼠单次和多次给予金振口服液后血浆中各成分平均浓度-时间曲线比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

表6 经大鼠单次和多次给予金振口服液后各成分的药动学参数比较  $\bar{x} \pm s, n=7$ 

分析物	参数/单位	单次给药(中剂量)	多次给药
黄芩苷	$AUC_{0-t} / \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	6 691.3 ± 1 627.5	4 902.4 ± 1 935.6
	$AUC_{0-\infty} / \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	6 696.1 ± 1 631.1	4 930.3 ± 1 956.6
	$C_{\text{max}} / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	732.4 ± 428.9	573.0 ± 238.5
	$T_{\text{max}} / \text{h}$	5.2 ± 4.1	4.3 ± 2.2
	$t_{1/2\alpha} / \text{h}$	2.9 ± 1.8	2.0 ± 1.5
	$CL_z / F / \text{L} \cdot \text{h} \cdot \text{kg}^{-1}$	2.6 ± 0.6	4.0 ± 2.2
汉黄芩苷	$AUC_{0-t} / \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	2 441.1 ± 742.9	2 001.8 ± 828.2
	$AUC_{0-\infty} / \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	2 441.3 ± 743.2	2 003.9 ± 829.4
	$C_{\text{max}} / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	217.9 ± 96.6	207.6 ± 103.3
	$T_{\text{max}} / \text{h}$	5.3 ± 4.3	3.5 ± 2.5
	$t_{1/2\alpha} / \text{h}$	2.1 ± 1.1	1.7 ± 0.8
	$CL_z / F / \text{L} \cdot \text{h} \cdot \text{kg}^{-1}$	1.4 ± 0.4	1.9 ± 0.9

## 讨 论

本研究在前期体外成分谱研究<sup>[14]</sup>的基础上,初步确定并优化了17种代表性成分(贝母素甲、贝母素乙、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、白杨素-7-O-葡萄糖醛酸苷、千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、没食子酸、甘草苷、甘草酸、甘草次酸、胆酸)的检测条件,经预实验研究发现,大鼠血浆中仅黄芩苷、汉黄芩苷的含量较高。据文献报道黄芩苷在光、热和趋碱性条件下不稳定,而在pH 3~5条件下稳定性较好<sup>[20]</sup>。本实验研究过程中亦发现黄芩苷对照品用甲醇溶解,4℃放置1周后黄芩苷的量明显减少,但在pH 3~5甲醇溶液中放置1个月后仍稳定。因此,后续系统考察了不同种类的酸<sup>[10,21-22]</sup>(盐酸、甲酸、乙酸)、有机溶剂<sup>[23-25]</sup>(甲醇、乙腈)及处理方法(蛋白沉淀,液液萃取)等的影响,发现大鼠血浆样品加入4%乙酸溶液(含1%抗坏血酸)后甲醇沉淀蛋白,能明显改善黄芩苷和汉黄芩苷的稳定性、回收率及峰型。最终确定了检测指标为黄芩苷、汉黄芩苷,前处理方法为加入4%乙酸溶液(含1%抗坏血酸)后甲醇沉淀蛋白法。经系统的方法学验证,证明所建立的血浆样品定量方法专属性强、准确、稳定,符合生物样品定量要求,能满足后续大鼠给药后的药动学研究。

大鼠单次ig不同剂量金振口服液后,2种成分的 $AUC_{0-t}$ 与剂量呈现良好的依赖关系, $t_{1/2\alpha}$ 无显著差异;大鼠多次给药后,黄芩苷和汉黄芩苷的 $AUC_{0-t}$ 和 $t_{1/2\alpha}$ 亦无显著差异。表明在所设定的剂量

范围内,金振口服液中主要成分在大鼠体内呈线性动力学特征,多次给药后无蓄积现象,揭示了该制剂临床剂量的合理性。

此外,本研究发现大鼠体内的黄芩苷和汉黄芩苷的吸收存在明显的双峰现象,表明它们在体内能够通过肝肠循环发生二次吸收,与李涛等<sup>[26]</sup>报道一致。推测可能是黄芩苷、汉黄芩苷的首过效应较强,或黄芩素、汉黄芩素经肝药酶代谢生成黄芩苷、汉黄芩苷,排泄后经肝肠循环发生二次吸收;亦可能是由于制剂中其他极性较大的黄芩素或汉黄芩素多糖苷类成分口服后直接吸收较差,但在肠道微生物作用下降解,生成黄芩苷或汉黄芩苷,发生再次吸收。确切的发生机制尚需进一步验证。

## [参 考 文 献]

- [1] 段永彬, 歹丽红, 张俊霞. 金振口服液联合美洛西林治疗小儿急性支气管炎的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2021, 36(5): 1036-1039.
- [2] 申广红, 王锐, 王鑫纳, 等. 金振口服液联合注射用炎琥宁治疗小儿病毒性肺炎的临床疗效及对症状体征评分、炎症因子和肺功能的影响[J]. 中国医院用药评价与分析, 2021, 21(2): 143-146.
- [3] 李蓉. 金振口服液联合氨溴特罗治疗小儿急性支气管炎的临床研究[J]. 临床研究, 2021, 29(2): 107-109.
- [4] 洪倩, 陈昌秀, 刘艳侠, 等. 金振口服液退热作用机制动物实验研究[J]. 儿科药理学杂志, 2021, 27(2): 1-4.
- [5] 李素君, 张海欧, 徐铁. 金振口服液对慢性支气管炎大鼠的疗效观察[J]. 中国当代医药, 2019, 26(36): 4-7, 253.
- [6] 宗绍波, 孙兰, 吕耀中, 等. 金振口服液对LPS致急性肺损伤模型小鼠NF-κB, MAPK信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(9): 155-159.
- [7] 孙兰, 李家春, 徐连明, 等. 不同工艺金振口服液药效实验比较研究[J]. 中医药导报, 2014, 20(9): 79-82.
- [8] 苏真真, 张新庄, 李娜, 等. 利用网络药理学方法考察金振口服液抗呼吸道感染的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(17): 165-171.
- [9] 陶晓倩, 柯志鹏, 张新庄, 等. 基于网络药理学和分子对接

- 技术的金振口服液干预新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的作用机制研究[J]. 中草药, 2020, 51(9): 2326-2333.
- [10] 萧伟, 郑丽舒, 尚强, 等. 金振口服液抗甲型 H1N1 流感病毒作用实验研究[J]. 中草药, 2009, 40(9): 1443-1445.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [12] 李海波, 杨群, 区伟珍, 等. 金振口服液氨基酸特征指纹图谱及 29 种氨基酸同时定量的质量控制方法研究[J]. 中草药, 2020, 51(23): 5972-5979.
- [13] 李海波, 王团结, 杨群, 等. 金振口服液 HPLC-UVD-ELSD 特征指纹图谱及 13 个成分同时定量的整体质量控制研究[J]. 中草药, 2020, 51(22): 5737-5747.
- [14] GUO JY, WANG DM, WANG MJ, *et al.* Systematically characterize the substance basis of Jinzhen oral liquid and their pharmacological mechanism using UPLC-Q-TOF/MS combined with network pharmacology analysis[J]. *J Food Drug Anal*, 2019, 27(3): 793-804.
- [15] 于蓓蓓, 闫雪生, 周洪雷. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 谱-效相关的柴胡-黄芩药对解热质量标志物的筛选及含量测定方法的建立[J]. 中草药, 2022, 53(7): 1983-1992.
- [16] 龙宇, 向燕, 谭裕君, 等. 黄芩苷药理作用及新剂型的研究进展[J]. 中草药, 2019, 50(24): 6142-6148.
- [17] 申云富, 范小青. 汉黄芩苷的药理活性研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2016, 30(4): 98-101.
- [18] 葛孚晶, 曾晨鸣, 严芳洁, 等. 甘草酸: 一种治疗新型冠状病毒肺炎的潜在药物[J]. 药学报, 2021, 56(5): 1211-1216.
- [19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版. 四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [20] 于波涛, 张志荣, 刘文胜, 等. 黄芩苷稳定性研究[J]. 中草药, 2002, 33(3): 218-220.
- [21] 康宁芳, 李梅, 胡贺佳, 等. UPLC-MS/MS 同时测定舒肝宁注射液在大鼠血浆中 4 种活性成分的含量及其药代动力学研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(11): 2626-2633.
- [22] 杨梦玲, 尤朋涛, 何丽珊, 等. 基于 UPLC-MS/MS 分析胃溃疡模型大鼠口服加味小柴胡颗粒后血浆中 8 种有效成分的药代动力学[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(18): 3748-3755.
- [23] 吕晋, 崔庆德, 方慧祥. HPLC 波长切换法同时测定通幽润燥丸中 9 种活性成分[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(13): 1716-1720.
- [24] 刘庆焕, 白建疆, 张岩, 等. 基于指纹图谱、模式识别及多成分定量的金花清感颗粒质量评价研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(21): 2701-2707.
- [25] 吴芸, 叶慧, 陈骁鹏. HPLC 同时测定川芎清脑颗粒中 8 种成分[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(6): 721-725.
- [26] 李涛, 王怡薇, 王彦礼, 等. 黄芩汤血浆中多成分 LC-MS 法测定及其药代动力学特征研究[J]. 药学报, 2013, 48(6): 917-924.

编辑:刘卓越/接受日期:2022-07-26