

LC-MS/MS 同时测定大鼠血浆中安神补心六味丸的 3 种有机酸类成分及药动学研究

王翼遥¹, 黄鹤², 高云航¹, 宋玲¹, 李晗¹, 王慧颖¹, 彭博¹, 侯红平¹, 叶祖光¹, 陈俊苗³, 张广平^{1*}, 陈腾飞^{1*}
(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 辽宁师范大学, 辽宁 大连 116000; 3. 上海爱博才思分析仪器贸易有限公司北京分公司, 北京 100010)

摘要:目的 建立大鼠血浆中肉桂酸(cinnamic acid, CA)、香草酸(vanillic acid, VA)和 3,3'-O-二甲基鞣花酸(3,3'-O-dimethyl-ellagic acid, DMA)浓度测定的液相色谱-串联质谱联用(LC-MS/MS)分析方法,研究给药不同剂量安神补心六味丸(Anshen Buxin Liuwei Pills, ASBX)后 3 种成分的药动学过程及量暴关系。**方法** 雄性 SD 大鼠灌胃给药不同剂量 ASBX 后采集不同时间点血浆并采用蛋白沉淀法处理,采用 LC-MS/MS 法测定血浆中 CA、VA 和 DMA 的浓度,用 MaS Studio 软件计算药动学参数,采用置信区间法分析给药剂量和系统暴露水平的相关性。**结果** 在线性范围内 3 种化合物线性关系良好,该方法专属性、精密度与准确度、回收率、基质效应和稳定性均满足生物样品的测定要求。大鼠单次灌胃给药 ASBX 后,CA、VA 和 DMA 的 t_{max} 分别为 0.22~0.40、0.08 和 5.40~8.20 h, $t_{1/2}$ 分别为 0.79~2.04、0.37~0.65 和 4.26~9.58 h, ρ_{max} 分别为 279.70~302.88、16.42~43.33、2.81~7.20 ng·mL⁻¹, AUC_{0-∞} 分别为 351.83~537.96、7.20~18.82、29.27~119.64 ng·h·mL⁻¹。随着给药剂量的增加,VA 和 DMA 在大鼠体内的 ρ_{max} 和 AUC,以及 CA 的 AUC 均与剂量呈正相关,但是 CA 的 ρ_{max} 则与剂量无明确相关性。**结论** 该分析方法快速、灵敏、准确,适合大鼠灌胃给药 ASBX 后的药动学研究,为其药效物质基础研究和临床安全有效用药提供了参考。

关键词:安神补心六味丸;药动学;液相色谱-串联质谱联用;肉桂酸;香草酸;3,3'-O-二甲基鞣花酸

doi:10.11669/cpj.2024.17.009 中图分类号:R285 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)17-1620-09

Simultaneous Determination of Three Organic Acids of Anshen Buxin Liuwei Pills in Rat Plasma Using LC-MS/MS and Pharmacokinetic Study

WANG Yiyao¹, HUANG He², GAO Yunhang¹, SONG Ling¹, LI Han¹, WANG Huiying¹, PENG Bo¹, HOU Hongping¹, YE Zuguang¹, CHEN Junmiao³, ZHANG Guangping^{1*}, CHEN Tengfei^{1*} (1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Liaoning Normal University, Dalian 116000, China; 3. Beijing Application Center, SCIEX China, Beijing 100010, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for determination of cinnamic acid (CA), vanillic acid (VA) and 3,3'-O-dimethyl-ellagic acid (DMA) concentrations in rat plasma and evaluate the pharmacokinetics and the correlations between dose and systemic exposure levels of CA, VA and DMA in rats after single dose administration of Anshen Buxin Liuwei Pills (ASBX). **METHODS** Blood was collected from male SD rats at different time points after different dose administration. The plasma was processed by protein precipitation method. The concentrations of CA, VA and DMA in plasma were determined by LC-MS/MS method. Pharmacokinetic parameters were calculated with MaS Studio software. The correlations between dose and systemic exposure level were analyzed by confidence interval method. **RESULTS** The linear relationship of the calibration curves of the three compounds were good within the tested ranges, and the specificity, precision and accuracy, recovery, matrix effect and stability of the method all met the requirements for biological sample assay. After single intragastric administration of ASBX, the t_{max} of CA, VA and DMA were 0.22–0.40, 0.08 and 5.40–8.20 h, the $t_{1/2}$ were 0.79–2.04, 0.37–0.65 and 4.26–9.58 h, the ρ_{max} were 279.70–302.88, 16.42–43.33, and 2.81–7.20 ng·mL⁻¹, and the AUC_{0-∞} were 351.83–537.96, 7.20–18.82, and 29.27–119.64 ng·h·mL⁻¹, respectively. The results of confidence interval analysis showed that the ρ_{max} and AUC of VA and DMA, and AUC of CA were positively correlated with dose, but the ρ_{max} of CA was not clearly correlated with dose. **CONCLUSION** The LC-MS/MS analysis method is proved to be rapid,

基金项目:国家重点研发计划项目资助(2018YFC1708200,2018YFC1708204);内蒙古自治区科技重大专项资助(2019ZD004)

作者简介:王翼遥,女,硕士研究生 研究方向:中药药理毒理 * 通讯作者:张广平,男,博士,研究员 研究方向:中药药理毒理
Tel:(010)64031832;陈腾飞,男,博士,副研究员 研究方向:中药药动学 Tel:(010)64031832

sensitive, and accurate, so it can be applied to the pharmacokinetic study of ASBX after intragastric administration in rats. This study provides a reference for future research on the pharmacodynamic material basis and safe and effective clinical use of ASBX.

KEY WORDS: Anshen Buxin Liuwei Pills; pharmacokinetics; LC-MS/MS; cinnamic acid; vanillic acid; 3,3'-*O*-dimethylelagic acid

安神补心六味丸(Anshen Buxin Liuwei Pills, ASBX)(吉如和-6)是蒙医药经典复方制剂,由牛心、木香、肉豆蔻、丁香、枫香脂、广枣等6味药材组成,具祛“赫依”、镇静、养血安神之功效,临床上多用于治疗冠心病、心绞痛、心律失常等^[1-3],也可用于治疗肝郁气滞所致的心烦、焦虑、失眠、健忘等^[4-5]。方中牛心为主药,补心、止痛;广枣强心、镇静;肉豆蔻镇心赫依;丁香抑制主脉“赫依”;枫香脂燥希拉乌素、止痛;佐木香调理赫依血不和^[6]。研究表明,有机酸类对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有保护作用^[7-8],而ASBX中含有包括肉桂酸(cinnamic acid, CA)、香草酸(vanillic acid, VA)和3,3'-*O*-二甲基鞣花酸(3,3'-*O*-dimethylelagic acid, DMA)等在内的多种有机酸类化合物^[9]。有研究显示,CA预处理后能够减少大鼠的心肌缺血再灌注损伤,起到保护心肌功能的作用^[10-11],VA具有较强的抗氧化活性,可通过减少丙二醛含量和增强超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等内源性抗氧化酶的作用,发挥保护心肌的作用^[12-13]。DMA具有一定的抗氧化性,文献^[14]通过DPPH自由基和CCl₄诱导的脂质过氧化实验发现DMA通过发挥其抗氧化性而起到保护肝脏的作用。因此,有必要对给药ASBX后血浆中3种有机酸进行定量研究,为ASBX的药效物质研究提供数据支撑。

中药药动学研究在中药研究与开发过程中发挥着连接化学、药理和临床等学科的作用,是研究中药体内多组分、多靶点药效物质基础和安全性等研究的重要环节^[15-18]。目前对ASBX的药动学研究主要涉及单体成分给药后,或者含有某味药材的其他复方制剂给药后动物体内的药动学研究^[19-21],未见有给药ASBX后相关成分在动物体内药动学研究的报道。给药剂量和系统暴露水平相关性研究可以反映发挥药效或者引起毒副作用的药物成分与给药剂量之间的关系,为中药安全、有效用药提供指导^[22-23]。本课题组从6只给药ASBX后大鼠的血清中共鉴定到17种共有成分,其中包括CA、VA和DMA等有机酸,以及其他5种不同类型的成分能够进行定量分析,考虑到各成分的化学性质不同,本实验采用高效

液相串联质谱(HPLC-MS/MS)建立了同时测定大鼠血浆中CA、VA和DMA的方法,对不同剂量灌胃给药ASBX后大鼠血浆中3种成分的浓度进行分析,获得了单次不同剂量给药后的药动学特征,并分析了给药剂量和系统暴露水平的相关性,为蒙药ASBX的物质基础研究,以及临床安全有效用药提供数据支撑。

1 材料

1.1 药物与试剂

CA(批号:110786-201604)、VA(批号:110776-201503)、内标氯霉素(批号:130555-201704)购于中国食品药品检定研究院;DMA(批号:C11271271)购于上海麦克林生化科技有限公司。以上化合物的纯度均大于98%。ASBX(批号:190722,CA、VA和DMA的浓度分别为598、51、18 μg·g⁻¹)由内蒙古奥特奇蒙药股份有限公司提供。甲醇,乙腈,甲酸和丙酮均为色谱纯;娃哈哈饮用纯净水购于中国杭州娃哈哈集团有限公司,分析物和内标的结构见图1。

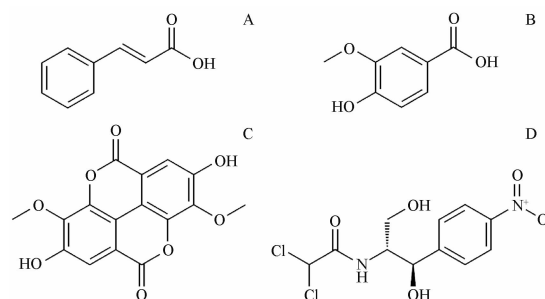


图1 肉桂酸(CA)(A)、香草酸(VA)(B)、3,3'-*O*-二甲基鞣花酸(DMA)(C)和内标氯霉素(D)的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of cinnamic acid (CA)(A), vanillic acid (VA)(B), 3,3'-*O*-dimethylelagic acid (DMA)(C) and chloramphenicol (internal standard, IS)(D)

1.2 仪器

Qtrap 5500 超高灵敏度三重四极杆串联线性离子阱液质联用系统,包括 ExionLC AC 液相色谱仪和 Qtrap 5500 质谱仪,系统工作软件为 Analyst 1.7(美国 SCIEX 公司);Centrifuge 5254R 离心机(德国

Eppendorf公司);Vortex-genie2 G560E 漩涡仪(美国 Scientific Industries 公司);RVC 2-18 CDplus 真空浓缩仪(德国 Christ 公司);MS105DU 十万分之一电子天平(德国 Mettler-Toledo 公司)。

1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠,雄性,体质量 160 ~ 220 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2016-0006。动物实验经中国中医科学院中药研究所动物伦理委员会批准(2020B044)。实验动物饲养于中国中医科学院中药研究所动物房,许可证号 SYXK(京)2019-0003,饲养条件为温度(23 ± 1) °C,相对湿度(50 ± 15)%,12 h 昼夜交替,正常饮食饮水,适应性饲养至少 5 d,给药前禁食 12 h 以上。

1.4 分析条件

1.4.1 色谱条件 色谱柱为岛津 Shim-pack Velox SP-C₁₈(2.1 mm × 100 mm, 2.7 μm);流动相为

0.05% 甲酸水(A)-甲醇(B)体系,梯度洗脱(0 ~ 0.5 min,20% B;0.5 ~ 2.0 min,20% ~ 98% B;2.0 ~ 2.5 min,98% B;2.5 ~ 2.6 min,98% ~ 20% B;2.6 ~ 5.0 min,20% B);流速 0.3 mL · min⁻¹;柱温 40 °C;进样体积 5 μL;自动进样器温度 6 °C。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),负离子模式,源参数为:喷雾电压 - 4 500 V;气帘气(CUR,N₂)压力为 241.33 kPa;碰撞气(CAD)为 Medium;辅助气 1(GS1,N₂)和辅助气 2(GS2,N₂)压力均为 310.28 kPa;辅助气加热温度(TEM)500 °C。采用多反应监测(MRM)模式,CA、VA、DMA 和内标氯霉素的定量分析离子对(*m/z*)分别为 147.1 → 103.1、167.1 → 152.0、329.1 → 314.0、321.1 → 152.1,碰撞能分别为 - 15.0、- 19.0、- 24.0、- 24.0 eV,去簇电压分别为 - 72.0、- 60.0、- 44.0、- 148.0 V。分析物和内标的二级质谱图见图 2。

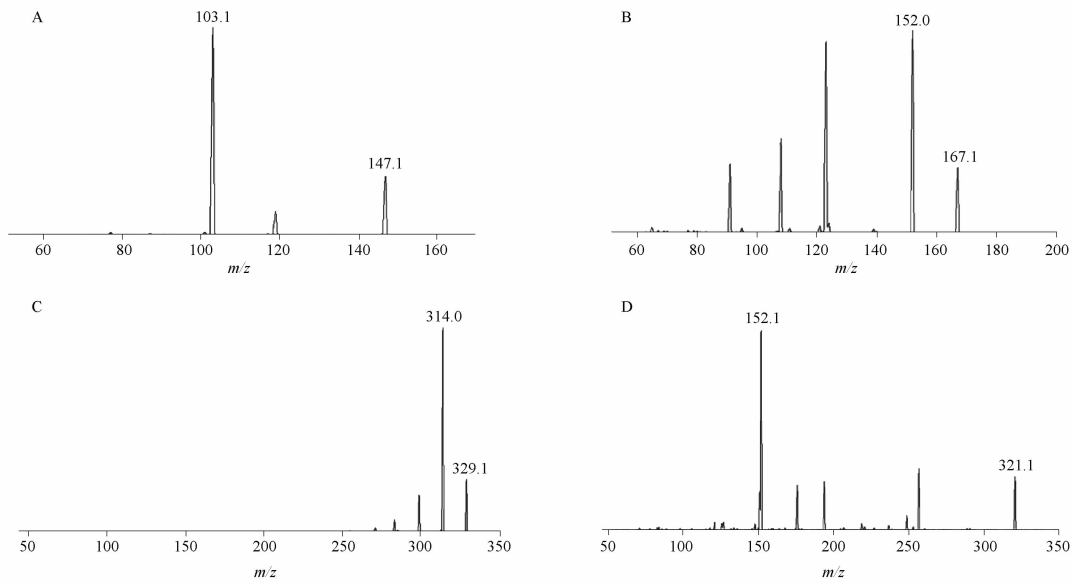


图 2 CA(A)、VA(B)、DMA(C)和内标(D)的二级质谱图

Fig. 2 Precursor and product ion mass spectrum of cinnamic acid(A), vanillic acid (B), 3,3'-O-dimethylellagic acid (C) and IS (D)

2 方法与结果

2.1 混合标准曲线工作溶液配制

称取 CA、VA 和 DMA 对照品适量,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇超声溶解后定容,摇匀后取该母液适量,分别用甲醇稀释成质量浓度均为 1 mg · mL⁻¹的对照品储备液。取一定量的各化合物储备液,混合后加甲醇配制成 CA、VA 和 DMA 质量浓度分别为 30、10 和 10 μg · mL⁻¹的混合标准溶液(MIX0),用甲醇按一定比例将 MIX0 稀释成 CA 浓

度为 6 000、4 500、3 000、600、300、60、30 ng · mL⁻¹,VA 和 DMA 质量浓度为 2 000、1 500、1 000、200、100、20、10 ng · mL⁻¹的系列混合标准曲线工作溶液,-80 °C 冰箱冷冻保存。

2.2 混合质控工作溶液和定量下限工作溶液配制

另用甲醇稀释 MIX0,得 CA 质量浓度为 4 500、600、60 ng · mL⁻¹,VA 和 DMA 质量浓度为 1 500、200、20 ng · mL⁻¹的高、中、低浓度混合质控(quality control, QC)工作溶液;以及 CA 质量浓度为

30 ng · mL⁻¹, VA 和 DMA 质量浓度为 10 ng · mL⁻¹ 的混合定量下限 (lower limit of quantitation, LLOQ) 工作溶液, -80 °C 冰箱冷冻保存。

2.3 内标溶液配制

精密称取氯霉素适量,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇超声溶解后定容至刻度,摇匀后取该母液适量,用甲醇稀释成氯霉素质量浓度为 1 mg · mL⁻¹ 的内标储备液。用丙酮将内标储备液稀释成氯霉素质量浓度为 10 ng · mL⁻¹ 的内标溶液, -80 °C 冰箱冷冻保存。

2.4 样品处理

取血浆样品 50 μL,加入内标溶液(氯霉素质量浓度为 10 ng · mL⁻¹)400 μL,涡旋 1 min,超声 1 min,

4 °C、14 000 r · min⁻¹ 离心 5 min,取上清 400 μL,47 °C、1 700 r · min⁻¹ 减压浓缩至干燥,加入甲醇 50 μL,涡旋 1 min,超声 1 min,4 °C、14 000 r · min⁻¹ 离心 5 min,取上清 5 μL 进样分析。

2.5 方法学验证

2.5.1 专属性 取大鼠空白血浆 50 μL 加入丙酮 400 μL,之后按“2.3”项下继续处理并进行分析。取混合标曲溶液的血浆、给药 ASBX (2.16 g · kg⁻¹) 后 5 min 的大鼠血浆各 50 μL,按“2.4”项下处理后进样分析。血浆中内源性物质对各待测物和内标均无干扰,血浆样品中 CA、VA、DMA 和内标氯霉素的保留时间分别为 4.00、3.43、4.01 和 3.71 min,代表性样品色谱图见图 3。

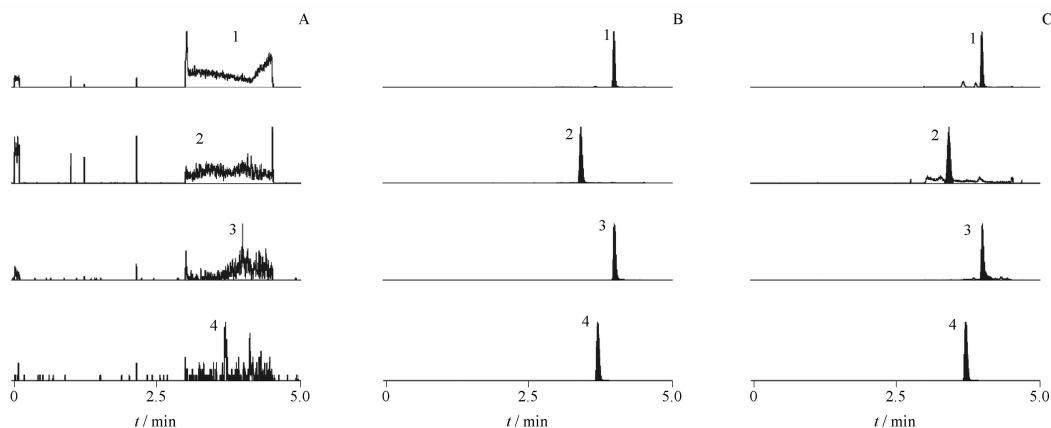


图3 大鼠空白血浆样品(A)、含标准品血浆样品(B)、灌胃给药 5 min 后血浆样品(C)中 CA(1)、VA(2)、DMA(3)和内标氯霉素(4)的色谱图

Fig. 3 Representative multiple reaction monitoring(MRM) chromatograms of CA (1), VA (2), DMA (3) and IS (4) in blank rat plasma(A), blank rat plasma spiked with the analyte and IS(B), and plasma sample at 5 min after oral administration(C)

2.5.2 标准曲线、定量下限及残留效应 取“2.1”项下系列混合标准曲线工作溶液和“2.2”项下混合 LLOQ 工作溶液各 10 μL,各加入大鼠空白血浆 90 μL,涡旋混匀,得 CA 质量浓度为 3、6、30、60、300、450、600 ng · mL⁻¹,VA 和 DMA 质量浓度为 1、2、10、20、100、150、200 ng · mL⁻¹ 的混合标准曲线血浆样品和 CA 质量浓度为 3 ng · mL⁻¹,VA 和 DMA 质量浓度为 1 ng · mL⁻¹ 的混合 LLOQ 血浆样品,之后各取 50 μL,按“2.4”项下进行样品处理并分析。以待测物与内标的峰面积比值为纵坐标,待测物浓度为横坐标,采用加权(1/X²)最小二乘法进行线性回归分析,VA 和 DMA 的标准曲线回归方程为: Y=0.000 698X+0.008 13(r=0.994 4),Y=0.001 12X+0.004 18(r=0.995 3),Y=0.043 2X+0.048 6(r=0.998 7),说明血浆样品中肉桂酸在

3~600 ng · mL⁻¹,VA 和 DMA 在 1~200 ng · mL⁻¹ 内线性关系良好,可用于血浆样品中 3 种待测物的浓度分析。定量下限为 3、1、1 ng · mL⁻¹,信噪比(S/N)均 ≥ 10,精密度相对标准偏差(RSD) ≤ 20%,准确度在 80%~120% 以内,结果见表 1。运行完定量上限样品后测定空白血浆样品,空白血浆样品中 3 种待测物和内标的保留时间处均未发现有干扰峰,说明该方法无残留效应。

2.5.3 精密度与准确度 取“2.2”项下低、中、高浓度混合 QC 工作溶液各 10 μL,加入大鼠空白血浆 90 μL,涡旋混匀,得 CA 质量浓度为 6、60、450 ng · mL⁻¹,VA 和 DMA 质量浓度为 2、20、150 ng · mL⁻¹ 的混合质控样品,之后各取 50 μL,按“2.4”项下进行样品处理并分析,每个批次每个质控样品 6 个重复样,连续测定 3 d,3 个化合物的批内精密度 RSD 在 2.3%~14.2%,

准确度在 87.9% ~ 106.4%, 批间精密度 RSD 在 5.7% ~ 11.4%, 准确度在 86.4% ~ 106.7%, 结果见表 1。

表 1 大鼠血浆样品中各待测物的定量下限、精密度和准确度。 $\bar{x} \pm s$

Tab. 1 The lower limit of quantitation, accuracy and precision of the analytes in rat plasma. $\bar{x} \pm s$

Analytes	$\rho(\text{Spiked})$ / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	Intra-day ($n = 6$)			Inter-day ($n = 18$)		
		$\rho(\text{Measured})$ / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD /%	RE /%	$\rho(\text{Measured})$ / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD /%	RE /%
Cinnamic acid	3.0	3.1 ± 0.2	4.9	103.6	3.2 ± 0.2	7.2	105.6
	6.0	6.1 ± 0.4	6.5	102.1	6.0 ± 0.4	6.9	99.3
	60.0	57.2 ± 5.6	9.8	95.3	60.5 ± 6.32	10.5	100.8
	450.0	410.8 ± 16.0	3.9	91.3	452.5 ± 40.5	9.0	100.6
Vanillic acid	1.0	1.1 ± 0.1	8.6	106.4	1.1 ± 0.1	6.1	106.7
	2.0	2.0 ± 0.1	6.0	101.4	2.1 ± 0.1	6.7	104.0
	20.0	20.1 ± 1.6	7.8	100.3	20.7 ± 1.6	7.8	103.4
	150.0	144.1 ± 3.3	2.3	96.1	158.3 ± 11.7	7.4	105.5
3,3'-O-dimethylsuccinic acid	1.0	1.1 ± 0.2	14.2	105.4	1.1 ± 0.1	11.4	106.3
	2.0	1.9 ± 0.2	11.3	97.0	2.0 ± 0.2	8.3	97.3
	20.0	22.0 ± 1.0	4.5	87.9	21.6 ± 1.2	5.7	86.4
	150.0	135.3 ± 3.6	2.7	90.2	143.9 ± 15.0	10.4	95.9

2.5.4 基质效应与提取回收率 取娃哈哈纯净水 50 μL , 按“2.4”项下方法加入内标溶液并浓缩干燥, 之后加入 100 μL 对应浓度的低、高浓度 QC 溶液复溶, 处理后取上清进样分析, 测得待测物的峰面积为 A (每个浓度平行 6 份); 取 6 个不同来源大鼠空白血浆各 50 μL , 同法浓缩干燥、复溶并进样分析, 测得待测物的峰面积为 B; 取 6 个不同来源大鼠空白血浆, 按“2.5.3”项下方法制备低、高浓度的质控样品, 按“2.4”项下方法进行处理并分析, 测得待测物的峰面积为 C。B 与 A 的比值为基质效应, C 与 B 的比值为提取回收率。3 个待测物的基质效应在 85.8% ~ 122.0%, 提取回收率在 63.4% ~ 94.1%, 结果见表 2。

表 2 大鼠血浆样品中各待测物的基质效应和提取回收率。

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

Tab. 2 Matrix effect and recovery of the analytes in rat plasma.

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

Compound	$\rho(\text{Spiked})$ / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	Matrix effect /%	Recovery /%
Cinnamic acid	6.0	85.8 ± 8.1	84.0 ± 8.8
	450.0	90.8 ± 2.3	94.1 ± 7.4
Vanillic acid	2.0	82.7 ± 11.4	63.4 ± 5.4
	150.0	91.0 ± 4.1	79.9 ± 5.9
3,3'-O-dimethylsuccinic acid	2.0	122.0 ± 15.2	78.9 ± 9.1
	150.0	115.5 ± 5.0	92.0 ± 4.9

2.5.5 稳定性 选择低、中、高 3 个浓度的混合 QC 工作溶液, 按“2.5.3”项下方法制备相应浓度

的 QC 样品, 考察各浓度 QC 样品在不同工作条件下稳定性: 室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 放置 1 h、自动进样器 (6 $^{\circ}\text{C}$) 放置 24 h、-80 $^{\circ}\text{C}$ → 室温冻融循环 2 次、-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 30 d。QC 样品中化合物浓度变化不超过标示浓度的 15%, 稳定性实验结果见表 3。

2.6 大鼠体内药动学研究

大鼠按体质量随机分为 3 组, 包括 ASBX 低 (0.54 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、中 (1.08 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和高 (2.16 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 剂量组, 每组 5 只雄性大鼠。称取 ASBX 适量, 加入适量 0.5% CMC-Na, 超声溶解, 配制成质量浓度分别为 0.054、0.108、0.216 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 ASBX 药液, 按 10 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药, 各组分别在给药前 (0 min)、给药后 0.083、0.25、0.5、0.75、1、2、3、5、7、9、11 和 24 h 后, 大鼠在麻醉状态下眼眶静脉丛采血约 150 μL , 置 1.5 mL 肝素抗凝的离心管中, 于 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 转移血浆, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存。

采用已建立的 LC-MS/MS 分析方法对血浆样品进行定量分析, 以血药浓度为纵坐标, 时间为横坐标, 获得 ASBX 各给药组大鼠血浆中 3 种主要成分的平均血药浓度-时间曲线。采用 MaS Studio 1.5.2.14 软件非房室模型计算 CA、VA、DMA 在大鼠体内的等药动学参数, 应用 Microsoft Excel 处理数据, 实验数据用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

表3 大鼠血浆样品中各待测物在分析过程中的稳定性。n=6, $\bar{x} \pm s$

Tab. 3 Stability of the analytes in rat plasma in the process of analysis. n=6, $\bar{x} \pm s$

Analytes	ρ (Spiked) /ng · mL ⁻¹	Room (25 °C) 1 h		Autosampler (6 °C) 24 h		Freeze/thaw 2 times		Long-term 30 d	
		ρ (Measured) /ng · mL ⁻¹	Bias /%	ρ (Measured) /ng · mL ⁻¹	Bias /%	ρ (Measured) /ng · mL ⁻¹	Bias /%	ρ (Measured) /ng · mL ⁻¹	Bias /%
Cinnamic acid	6.0	6.2 ± 0.3	3.4	6.5 ± 0.2	8.8	5.9 ± 0.6	-2.5	6.2 ± 0.2	2.9
	60.0	62.8 ± 2.9	4.6	62.8 ± 4.3	4.7	56.0 ± 4.5	-6.8	62.1 ± 1.3	3.5
	450.0	495.5 ± 13.0	10.1	444.0 ± 29.1	-1.4	412.2 ± 18.7	-8.4	449.5 ± 10.2	-0.1
Vanillic acid	2.0	2.1 ± 0.2	3.8	2.1 ± 0.1	5.4	2.0 ± 0.2	1.9	2.1 ± 0.1	3.1
	20.0	21.3 ± 0.9	6.3	20.2 ± 1.2	0.8	19.9 ± 1.2	-0.3	20.9 ± 0.4	4.3
	150.0	163.0 ± 8.5	8.7	144.7 ± 6.2	-3.6	144.0 ± 4.0	-4.0	155.0 ± 1.8	3.3
3,3'-O-dimethylsuccinic acid	2.0	1.8 ± 0.1	-8.2	2.2 ± 0.1	10.1	2.1 ± 0.2	7.0	2.0 ± 0.1	1.5
	20.0	18.7 ± 0.8	-6.5	21.2 ± 1.3	5.9	21.8 ± 0.9	8.8	20.9 ± 0.5	4.5
	150.0	145.5 ± 13.6	-3.0	141.7 ± 8.7	-5.5	143.9 ± 9.0	-4.1	141.2 ± 5.9	-5.9

大鼠单次给药不同剂量的 ASBX 后, CA、VA、DMA 均在 5 min 吸收入血。CA 达峰迅速, 平均达峰时间(t_{max}) 在 0.22 ~ 0.40 h 之间, VA 达峰最快 t_{max} 为 0.08 h, DMA 达峰较慢, t_{max} 在 5.40 ~ 8.20 h 之间; CA 的平均半衰期($t_{1/2}$) 在 0.79 ~ 2.04 h 之间, 平均滞留时间(MRT) 在 1.26 ~ 3.00 h 之间, VA 的 $t_{1/2}$ 在 0.37 ~ 0.65 h 之间, MRT 在 0.48 ~ 0.92 h 之间, DMA 的 $t_{1/2}$ 在 4.26 ~ 9.58 h 之间, MRT 在 8.90 ~ 16.74 h 之间。

CA 在大鼠体内的暴露水平最高, 低、中、高剂量给药后其在体内的平均峰浓度(ρ_{max}) 分别为 (279.70 ± 113.86) (302.88 ± 113.79)

(283.65 ± 175.59) ng · mL⁻¹, 平均曲线下面积 (AUC_{0-∞}) 分别为 (351.83 ± 115.01) (479.1 ± 157.62) (537.96 ± 324.86) ng · h · mL⁻¹, VA 在大鼠体内的暴露水平低于 CA, 其 ρ_{max} 分别为 (16.42 ± 5.07) (36.68 ± 40.30) (43.33 ± 18.70) ng · mL⁻¹, AUC_{0-∞} 分别为 (7.20 ± 3.77) (10.83 ± 7.49) (18.82 ± 8.92) ng · h · mL⁻¹, DMA 在大鼠体内的暴露水平最低, 其 ρ_{max} 分别为 (2.81 ± 2.75) (4.98 ± 1.82) (7.20 ± 1.54) ng · mL⁻¹, AUC_{0-∞} 分别为 (29.27 ± 28.51) (91.76 ± 18.45) (119.64 ± 38.75) ng · h · mL⁻¹。药动学参数见表 4, 平均血药浓度-时间曲线图见图 4。

表4 大鼠单次多剂量给药 ASBX 后 CA、VA 和 DMA 的药动学参数。n=5, $\bar{x} \pm s$

Tab. 4 Pharmacokinetic parameters of CA, VA, and DMA in rat plasma after single dose administration of ASBX. n=5, $\bar{x} \pm s$

Analytes	Parameters	ASBX(0.54 g · kg ⁻¹)	ASBX(1.08 g · kg ⁻¹)	ASBX(2.16 g · kg ⁻¹)
Cinnamic acid	$t_{1/2}$ /h	0.79 ± 0.48	2.04 ± 0.75	1.79 ± 0.48
	t_{max} /h	0.40 ± 0.14	0.22 ± 0.07	0.30 ± 0.11
	ρ_{max} /ng · mL ⁻¹	279.70 ± 113.86	302.88 ± 113.79	283.65 ± 175.59
	AUC _{0-t} /ng · h · mL ⁻¹	337.31 ± 117.47	459.98 ± 154.3	507.45 ± 315.70
	AUC _{0-∞} /ng · h · mL ⁻¹	351.83 ± 115.01	479.1 ± 157.62	537.96 ± 324.86
	MRT _{0-∞} /h	1.26 ± 0.70	3.00 ± 1.06	2.67 ± 0.76
	Vanillic acid	$t_{1/2}$ /h	0.53 ± 0.69	0.37 ± 0.11
t_{max} /h		0.08 ± 0	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00
ρ_{max} /ng · mL ⁻¹		16.42 ± 5.07	36.68 ± 40.30	43.33 ± 18.70
AUC _{0-t} /ng · h · mL ⁻¹		6.87 ± 3.73	10.53 ± 7.49	17.44 ± 8.63
AUC _{0-∞} /ng · h · mL ⁻¹		7.20 ± 3.77	10.83 ± 7.49	18.82 ± 8.92
MRT _{0-∞} /h		0.76 ± 0.86	0.48 ± 0.15	0.92 ± 0.58
3,3'-O-dimethylsuccinic acid		$t_{1/2}$ /h	4.26 ± 1.95	9.58 ± 4.72
	t_{max} /h	5.40 ± 1.67	7.00 ± 1.41	8.20 ± 1.10
	ρ_{max} /ng · mL ⁻¹	2.81 ± 2.75	4.98 ± 1.82	7.20 ± 1.54
	AUC _{0-t} /ng · h · mL ⁻¹	23.15 ± 25.79	65.32 ± 38.89	102.21 ± 26.35
	AUC _{0-∞} /ng · h · mL ⁻¹	29.27 ± 28.51	91.76 ± 18.45	119.64 ± 38.75
	MRT _{0-∞} /h	8.90 ± 2.90	16.74 ± 6.92	13.30 ± 3.42

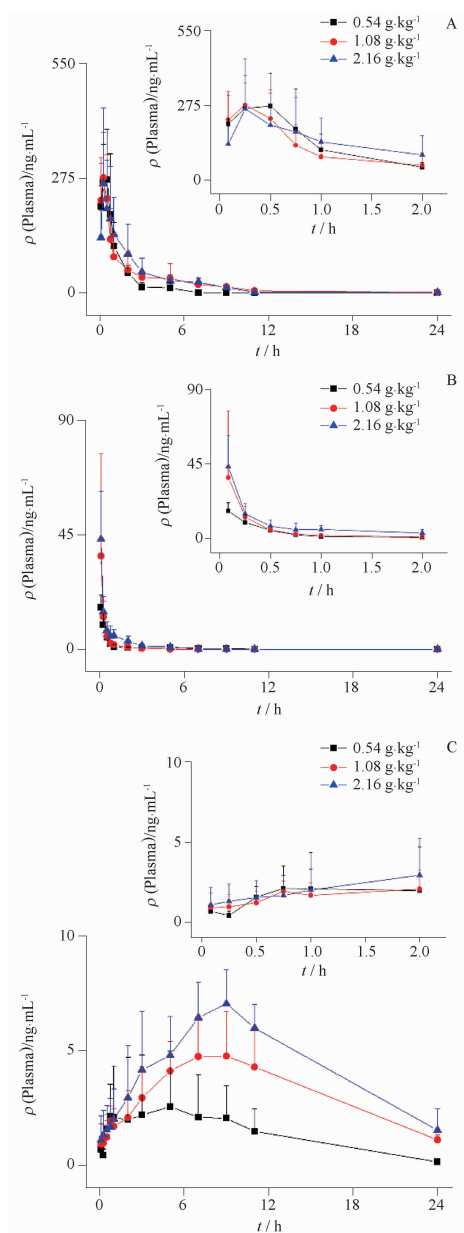


图4 大鼠单次给药 0.54、1.08、2.16 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ASBX 后 CA (A)、VA(B)和 DMA(C)的平均血药浓度-时间曲线。 $n=5$, $\bar{x} \pm s$

Fig. 4 Mean concentration-time curve of CA (A), VA (B), DMA (C) in rat plasma after single administration of 0.54, 1.08, 2.16 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ASBX. $n=5$, $\bar{x} \pm s$

采用置信区间法^[24-25]对3个化合物的系统暴露水平(ρ_{\max} 和AUC)与剂量进行相关性分析,结果见表5,拟合曲线见图5。CA的 ρ_{\max} 与剂量之间无明确相关性,AUC_{0-∞}与剂量呈正相关,为非线性相关;VA的 ρ_{\max} 与剂量成正相关,为非线性相关,AUC_{0-∞}与剂量成正相关,但是线性关系不确定;DMA的 ρ_{\max} 与剂量成正相关,为非线性相关,AUC_{0-∞}与剂量成正相关,但是线性关系不确定。

3 讨论

本研究开展前采用高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱(HPLC-Q-TOF-MS/MS)技术解析了给药ASBX后大鼠血清中的化学成分,血清样品中共鉴定到109个药物成分,其中17种成分为6只给药大鼠血清中的共有成分。之后通过药动力学预实验发现临床等效剂量给药后,大鼠血浆中能够定量的成分包括CA、VA和DMA等有机酸,以及其他5种不同类型的成分,考虑到各成分的化学性质不同,本课题组开发了不同的LC-MS/MS分析方法。

本研究建立了同时测定大鼠血浆中CA、VA和DMA等有机酸的LC-MS/MS方法。采用此方法分析了不同剂量灌胃给药ASBX后大鼠血浆中3种成分的浓度,系统考察了3种成分的药动力学特征,明确了给药剂量和3种成分系统暴露水平的相关性,为蒙药ASBX药效物质基础的研究提供了参考。但是ASBX作为一个复方,组成复杂,还需要在后续研究中对其他成分(类型)的药动力学特征进行考察。

血浆样品中有机酸类的处理方法有液-液萃取法和蛋白沉淀法等^[26-27]。本研究比较了甲醇、乙腈、丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷等不同蛋白沉淀试剂和萃取试剂,结果发现采用丙酮进行蛋白沉淀时3种成分的提取回收率均为最高。

ASBX每日临床最大服用生药量6g,按成人平均体质量60kg计算,为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,按体表面积换算成大鼠等效剂量(生药量)为 $0.54 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。药动力学研究表明,低、中、高剂量给药ASBX后,CA、VA和DMA在体内的 ρ_{\max} ,以及肉桂酸AUC的高低与ASBX中3种成分的含量高低保持一致,而VA和DMA的AUC则与二者的含量呈现出相反的结果,可能是由于二者的结构存在差异(VA为小分子的酚酸类化合物,DMA为多酚二内酯类化合物)而引起了大鼠体内代谢的不同。

大鼠灌胃给药ASBX后CA的 t_{\max} 比文献^[28-29]报道的长,而 $t_{1/2}$ 则基本一致,而复方给药后与单独灌胃CA^[30]的 t_{\max} 和 $t_{1/2}$ 均有所差异说明复方中的其他成分对CA的吸收和代谢均产生了不同程度的影响。VA在大鼠体内吸收最快(t_{\max} 为5min),而且代谢也较快,与文献^[31-32]报道的($t_{1/2}$ 在3.74~8.89h之间,MRT在3.15~4.45h之间)有差别,可能是在ASBX处方中存在药物之间的相互作用,加快了VA在大鼠体内的吸收和代谢。目前暂无DMA药动力学方面的相关报道,本研究的结果显示其吸收(t_{\max} 在5.40~8.20h)和代谢($t_{1/2}$ 在4.26~9.58h之间),

表5 大鼠单次多剂量给药 ASBX 后 3 种成分的系统暴露水平(ρ_{\max} 和 $AUC_{0-\infty}$) 分别与给药剂量的相关性

Tab. 5 Relationship between doses of ASBX and system exposure levels(ρ_{\max} and $AUC_{0-\infty}$) of three analytes in rat plasma after single dose administration

Analytes	PK parameters	r^2	P value	Slope(95% CI)	Conclusion ¹⁾
Cinnamic acid	ρ_{\max}	0.004	0.83	-0.04 (-0.47 -0.38)	No clear correlation with dose
	$AUC_{0-\infty}$	0.087	0.29	0.23 (-0.21 -0.67)	Positive correlation with dose. Nonlinear correlation
Vanillic acid	ρ_{\max}	0.317	0.03	0.67 (0.08 -1.26)	Positive correlation with dose. Uncertainty of linear relationship
	$AUC_{0-\infty}$	0.290	0.04	0.65 (0.04 -1.27)	Positive correlation with dose. Uncertainty of linear relationship
3,3'-O-dimethylsuccinic acid	ρ_{\max}	0.425	0.01	1.03 (0.31 -1.75)	Positive correlation with dose. Uncertainty of linear relationship
	$AUC_{0-\infty}$	0.471	0.00	1.45 (0.53 -2.36)	Positive correlation with dose. Uncertainty of linear relationship

注:1) - 将剂量, ρ_{\max} 和 $AUC_{0-\infty}$ 分别取对数后进行回归分析, 如果 ρ_{\max} 和 $AUC_{0-\infty}$ 斜率的 95% 置信区间分别完全落在判断区间 (ρ_{\max} 为 0.74 ~ 1.26, $AUC_{0-\infty}$ 为 0.84 ~ 1.16) 范围内, 则 ρ_{\max} 和 $AUC_{0-\infty}$ 在所研究剂量范围内 (0.54 ~ 2.16 g · kg⁻¹) 呈线性相关; 如果 95% CI 分别完全落在判断区间范围外, 则呈非线性相关; 如果 95% CI 与判断区间有重叠, 则线性关系不确定。

Note: Dose, ρ_{\max} and $AUC_{0-\infty}$ were logarithmic for regression analysis. If the 95% confidence interval (CI) of the slope of ρ_{\max} and $AUC_{0-\infty}$ was completely within the range of judgment interval (0.74 - 1.26 for ρ_{\max} and 0.84 - 1.16 for $AUC_{0-\infty}$), ρ_{\max} and $AUC_{0-\infty}$ were linearly correlated within the range of dose (0.54 - 2.16 g · kg⁻¹). If the 95% CI fell completely outside the range of the judgment interval, the correlation was nonlinear. If the 95% CI overlapped with the judgment interval, the linear relationship was uncertain.

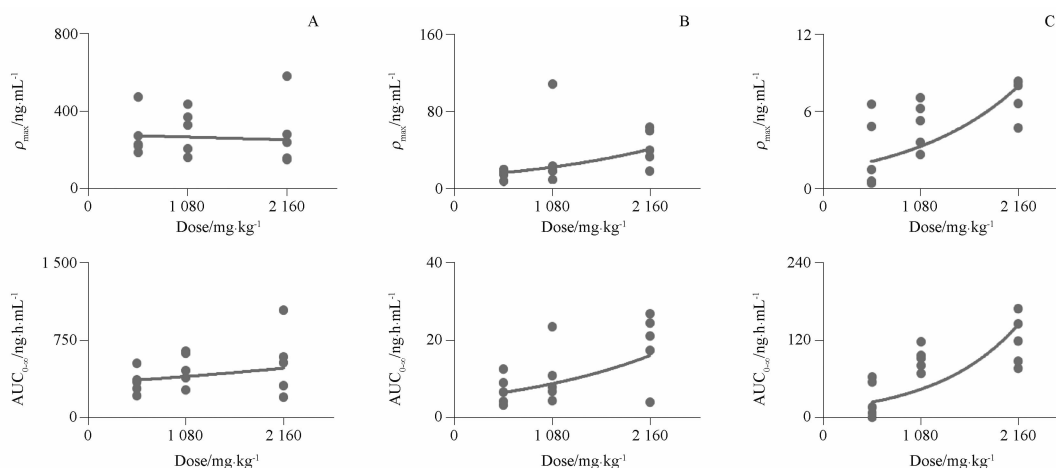


图5 大鼠单次多剂量给药 ASBX 后 CA(A)、VA(B) 和 DMA(C) 的 ρ_{\max} 和 $AUC_{0-\infty}$ 与给药剂量相关性的拟合曲线

Fig. 5 Correlations of ρ_{\max} and $AUC_{0-\infty}$ values of CA (A), VA (B), and DMA (C) in rat plasma with doses of ASBX after single dose administration

MRT 在 8.90 ~ 16.74 h 之间) 均较慢, 是否会引起体内蓄积需要进一步的实验验证。

给药剂量和系统暴露水平相关性研究结果表明, 随着 ASBX 给药剂量的增加, VA 和 DMA 在大鼠体内的 ρ_{\max} 和 AUC, 以及 CA 的 AUC 均随着剂量的增加而增加, 但是 CA 的 ρ_{\max} 并未呈现出增加的趋势, 可能是由于当药物浓度达到某一限度时, 体内的代谢酶或者载体的运输能力会达到饱和, 从而表现出不同给药剂量下吸收相同的结果^[33]。

REFERENCES

[1] TONG H Y, DONG Y, HUANG X, *et al.* Anshen Buxin Liuwei Pill, a Mongolian medicinal formula, could protect H2O2-induced H9c2 myocardial cell injury by suppressing apoptosis, calcium channel activation, and oxidative stress [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2022;5023654. DOI:10.1155/2022/5023654.

[2] XIAO J L, ZHANG D X, ZHAO L, *et al.* Mechanism of Anshen Buxin Six Pills in the treatment of coronary heart disease based on network pharmacology and molecular docking [J]. *China Pharm* (中国药师), 2021, 24(7):240-252.

[3] LIU X W, MEI L, XIN T Y, *et al.* Experimental study of Anshen Buxin Liuwei Pills on autonomous activity and sedative effect of mice [J]. *Asia-Pac Tradit Med* (亚太传统医药), 2021, 17(12):32-34.

[4] LIU J N, SHANG Y, XIAO J L, *et al.* Phenotype-based HPLC-Q-TOF-MS/MS coupled with zebrafish behavior trajectory analysis system for the identification of the antidepressant components in methanol extract of Anshen Buxin Six Pills [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:764388. DOI:10.3389/FPHAR.2021.764388.

[5] HUANG Y J, HUANG X J, ZHANG Z, *et al.* Mechanism of antidepressant effect of Anshen Buxin Liuwei pills based on network pharmacology [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2023, 39(3):569-579.

[6] GE R L Q Q G. Curative effect of Mongolian medicine on angina

- pectoris of coronary heart disease [J]. *World Latest Med Inf* (世界最新医学信息文摘), 2016, 16(94):203-204.
- [7] LI C M, HE J, GAO Y L, *et al.* Preventive effect of total flavones of *Choerospondias axillaries* on ischemia/reperfusion-induced myocardial infarction-related MAPK signaling pathway [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2014, 14(2):145-152.
- [8] TANG X L, LIU J X, DONG W, *et al.* The cardioprotective effects of citric acid and L-malic acid on myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2013, 2013(8):820695-820705.
- [9] XIAO J L, ZHAO L, ZHANG D X, *et al.* Identification of chemical constituents in Mongolian medicine Anshen Buxin Liuwei Pills based on HPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2021, 44(7):1656-1667.
- [10] HAO J P, GAO Y Q, HE S H, *et al.* Influence of cinnamic acid preconditioning on myocardial ischemia reperfusion injury and possible mechanism in rats [J]. *Chin J Evid Based Cardiovasc Med* (中国循证心血管医学杂志), 2016, 8(7):800-803.
- [11] GAO Y Q, HAO J P, ZHANG H K, *et al.* Protective effect of the combinations of glycyrrhizic, ferulic and cinnamic acid pretreatment on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(2):435-445.
- [12] CHOU T H, DING H Y, HUNG W J, *et al.* Antioxidative characteristics and inhibition of α -melanocyte-stimulating hormone-stimulated melanogenesis of vanillin and vanillic acid from *Origanum vulgare* [J]. *Exp Dermatol*, 2010, 19(8):742-750.
- [13] KUMAR S, PRAHALATHAN P, RAJA B. Antihypertensive and antioxidant potential of vanillic acid, a phenolic compound in L-NAME-induced hypertensive rats: a dose-dependence study [J]. *Redox Rep*, 2011, 16(5):208-215.
- [14] ITO M, SHIMURA H, WATANABE N, *et al.* Hepatoprotective compounds from *Canarium album* and *Euphorbia nematocarpa* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38(8):2201-2203.
- [15] FENG B B, ZHANG J H, XU X Y, *et al.* Advances in pharmacokinetics of Chinese herbal compounds [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2009, 40(S1):77-79.
- [16] WANG Q, XING M, TANG Q, *et al.* Pharmacokinetic study of puerarin of Zige Freeze-Dried powder in cerebral ischemia rats and normal rats [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2014, 49(7):583-587.
- [17] LI Z G, GAO Z B, GONG A H, *et al.* Pharmacokinetic study of ocotillol in rats by LC-MS/MS [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2018, 53(9):749-754.
- [18] LIU E L, XIE M, WANG Y F, *et al.* Pharmacokinetic study of total glucosides of paeony in rats with acute liver injury and normal rats [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2012, 47(7):534-538.
- [19] HOU P Y, ZENG Y, MA B J, *et al.* A fast, sensitive, and high-throughput method for the simultaneous quantitation of three ellagitannins from *Euphorbiae pekinensis* Radix in rat plasma by ultra-HPLC-MS/MS: other techniques [J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(15):2544-2551.
- [20] LIANG Y, MA T C, LI Y W, *et al.* A rapid and sensitive LC-MS/MS method for the determination of vanillic acid in rat plasma with application to pharmacokinetic study [J]. *Biomed Chromatogr*, 2021, 36(1):e5248. DOI:10.1002/BMC.5248.
- [21] SHETTY V, CHELLAMPILLAI B, KAUL-GHANEKAR R. Development and validation of a bioanalytical HPLC method for simultaneous estimation of cinnamaldehyde and cinnamic acid in rat plasma; application for pharmacokinetic studies [J]. *New J Chem*, 2020, 44(11):4346-4352.
- [22] LI C. Multi-compound pharmacokinetic research on Chinese herbal medicines: approach and methodology [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2017, 42(4):607-617.
- [23] HU Z Y, YANG J L, CHENG C, *et al.* Combinatorial metabolism notably affects human systemic exposure to ginsenosides from orally administered extract of *Panax notoginseng* roots (Sanqi) [J]. *Drug Metab Dispos*, 2013, 41(7):1457-1469.
- [24] WANG C, CHEN L, YANG J. Application of confidence interval in the assessment of dose proportionality [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2008, 39(6):534-537.
- [25] ZHAO M, YANG J, WEI M J. Using confidence interval method to assess linear pharmacokinetics in dose escalation study [J]. *Chin J Clin Pharmacol* (中国临床药理学杂志), 2015, 31(3):238-240.
- [26] WANG Y J, WANG Y M, WU X, *et al.* Simultaneous determination of three di-caffeoylquinic acids by UHPLC-MS/MS in rat plasma and its application to a comparative pharmacokinetic study in normal and acute lung injury rat [J]. *J Chromatogr B*, 2017, 1061/1062(2017):275-281.
- [27] ZHANG B, LIU X N, ZHOU Y, *et al.* Pharmacokinetics of styrax in different formulations after oral administration in SD rats [J]. *Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2012, 29(4):292-297.
- [28] GUAN J, WANG L M, JIN J, *et al.* Simultaneous determination of calycosin-7-O- β -D-glucoside, cinnamic acid, paeoniflorin and albiflorin in rat plasma by UHPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study of Huangqi Guizhi Wuwu Decoction [J]. *J Pharm Biomed*, 2019, 170(2019):1-7.
- [29] CHEN R, XU B, LV L H, *et al.* Pharmacokinetics of cinnamic acid contained in Jingshu granules in rats [J]. *World Clin Drugs* (世界临床药物), 2019, 40(3):170-177.
- [30] YANG B K, WANG S J, MO L L, *et al.* Studies on the absolute bioavailability of cinnamic acid in rats and its absorption properties [J]. *Pharm J Chin PLA* (解放军药理学学报), 2013, 29(3):185-188.
- [31] PAN Y N, ZHANG W J, ZHANG W, *et al.* Pharmacokinetic comparison of two phenolic acids after oral administration of Typhae pollen to normal rats and rats with acute cold blood stasis [J]. *Biomed Chromatogr*, 2017, 31(12):e4028. DOI:10.1002/bmc.4028.
- [32] DU Y, WANG Z B, WANG L B, *et al.* Simultaneous determination of seven phenolic acids in rat plasma using UHPLC-ESI-MS/MS after oral administration of *Echinacea purpurea* extract [J]. *Molecules*, 2017, 22(9):1494. DOI:10.3390/molecules22091494.
- [33] LEON S, ANDREW B C Y. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics* [M]. London: Prentice-Hall Co., 1993:375-376. (收稿日期:2023-07-05)