

血塞通注射液中人参皂苷 Rb₁ 的药动学研究

赵文萃, 王艳萍, 薛万俐, 赵力波 (中国人民解放军第 208 医院药剂科, 吉林 长春 130062)

摘要 目的: 测定血塞通注射液中人参皂苷 Rb₁ 在兔体内的药动学参数。方法: 采用高效液相色谱法以血塞通注射液中人参皂苷 Rb₁ 为指标进行测定。色谱柱: Diamonsil-C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm); 流动相: 乙腈-水 (3: 7); 检测波长: 203 nm; 流速: 1 mL/min; 柱温: 室温。结果: 血塞通注射液静脉注射后在兔体内呈二室开放模型分布, 经 3P97 程序处理, 得其药动学参数。结论: 该法简便, 准确可靠, 可用于血浆中人参皂苷 Rb₁ 的测定。

关键词 血塞通注射液; 药动学; 人参皂苷 Rb₁; 高效液相色谱法

中图分类号: R285 R945 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2007)03-0152-03

血塞通注射液为三七总皂苷的灭菌水溶液, 具有活血祛瘀, 通脉活络之功效。临床上主要用于治疗中风偏瘫、瘀血阻络证、动脉粥样硬化性血栓性脑梗塞、脑血栓、视网膜中央静脉阻塞见瘀血阻络证等各种脑血管疾病。主要含人参皂苷 Rb₁、Rg₁、Re 等活性成分, 本研究以人参皂苷 Rb₁ 为指标, 参照有关文献^[1]建立了反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 测定兔血浆中人参皂苷 Rb₁ 浓度, 并对人参皂苷 Rb₁ 在兔体内的药动学进行了研究。根据血塞通注射液静脉注射后在兔体内血药浓度-时间关系, 估算其药动学参数, 为指导临床用药提供科学依据。

1 试验材料

1.1 仪器 LC-10ATVP 高效液相色谱仪 (日本岛津公司), SPD-10A_{vp} 紫外检测器 (日本岛津公司), 80-2 离心机 (上海分析仪器厂), TGL-16 型高速离心机 (上海分析仪器厂), XW-80A 旋涡混合器 (上海科达测试仪器厂), CQX25-06 超声波清洗器 (上海必能信超声有限公司), SHH.W21.420 型恒温水浴箱 (河北黄骅市航天仪器厂)。

1.2 试剂 人参皂苷 Rb₁ 对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 0704-200012); 血塞通注射液 (黑龙江省珍宝岛制药有限公司, 批号: 20030913 规格: 2 mL: 100 mg); 乙腈为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其它试剂均为分析纯。

1.3 动物 大耳白兔 8 只, 雌雄各半, 体重 (2.3 ± 0.3) kg (解放军第 208 医院动物室提供)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (3: 7); 检测波长: 203 nm; 流速: 1 mL/min; 柱温: 室温。

2.2 兔血浆的制备 取大耳白兔, 耳缘静脉采血适量置于肝素化试管中, 4 000 r/min 离心 20 min, 取上清液得空白血浆, 备用。

2.3 血浆样品的采集与处理^[6] 取大耳白兔 8 只, 于耳缘静脉缓慢注射血塞通注射液 (70.40 mg/kg), 分别于即刻和 5、10、20、30、60、90、120、180、240、300、360、420、480 min 耳缘静脉采血约 2 mL, 置于肝素化试管中, 以 4 000 r/min 离心 20 min, 得血浆样品。取 1 mL 血浆样品, 100 °C 水浴 10 min 以 15 000 r/min 离心 20 min, 取上清液进行 HPLC 检测。

2.4 空白血浆色谱 分别取空白血浆 1 mL, 空白血浆和人参皂苷 Rb₁ 对照液各 0.5 mL (旋涡器混合 30 s)、血浆样品 1 mL; 按“2.3”项下操作, 取上清液 10 μL 进样, 得如下色谱图。血浆中杂质不干扰人参皂苷 Rb₁ 含量测定, 结果见图 1。

2.5 标准曲线的制备 精密称取人参皂苷 Rb₁ 对照品 8.27 mg 置 20 mL 容量瓶中, 加重蒸馏水溶解并稀释到刻度 (0.413 5 mg/mL)。分别取 0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4 mL 置于装有 0.5 mL 空白血浆的试管中, 用重蒸馏水补至 1 mL, 旋涡混合器混合 30 s 按“2.3”项下操作, 取上清液 10 μL 直接进样, 在上述色谱条件下进行 HPLC 测定。以峰面积积分值 (X) 为横坐标, 人参皂苷 Rb₁ 浓度 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程: $Y = 0.000001036X + 0.1948798$ $r = 0.9999$ 。线性范围: 41.35 ~ 265.40 μg/mL。

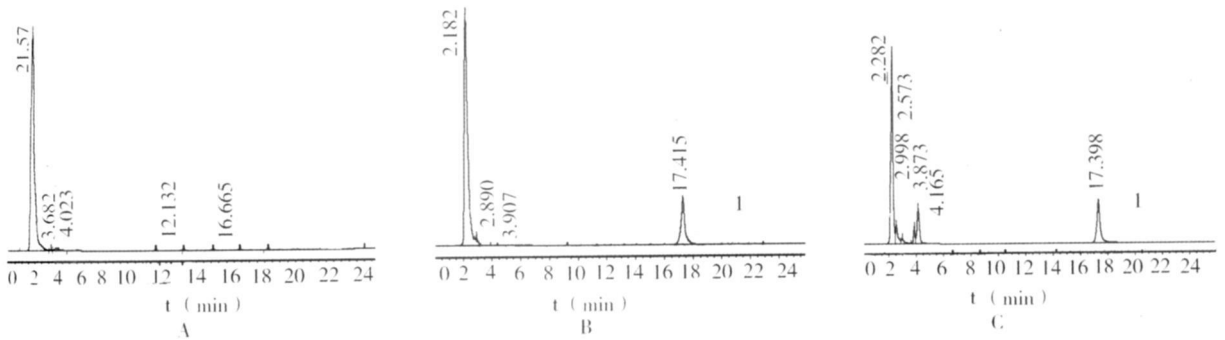


图 1 空白血浆 (A)、对照品 (B)和血浆样品 (C)高效液相色谱图

1-人参皂苷 R_{b1}

2.6 回收率试验 采用空白加样回收法, 分别于 0.5 mL 空白血浆中加入已知 3 种浓度的人参皂苷 R_{b1} 对照品溶液, 旋涡混合器混合 30 s, 按“2.3”项下操作, 取上清液 10 μL 进行 HPLC 检测, 平均加样回收率为 100.80%, RSD 为 1.38% (n=3), 结果见表 1。

表 1 兔血浆中人参皂苷 R_{b1} 回收率试验结果

投药量 (mg/mL)	测得量 (mg/mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.0828	0.0824	99.52	99.52	1.40
0.0828	0.0814	98.31		
0.0828	0.0834	100.72		
0.10338	0.1034	100.02	100.95	1.38
0.10338	0.1064	102.92		
0.10338	0.1033	99.92		
0.1240	0.1253	101.05	101.99	1.37
0.1240	0.1263	101.86		
0.1240	0.1278	103.06		

2.7 精密度试验 精密称取人参皂苷 R_{b1} 对照品适量, 配制成 0.0827 mg/mL 对照液, 精取对照液与空白血浆各 0.5 mL, 旋涡混合器混合 30 s, 按“2.3”项下操作, 取上清液 10 μL 重复进样 5 次, RSD 为 3.52% (n=5)。

2.8 药代动力学研究 分别精密量取“2.3”项下血浆样品各 10 μL, 在上述色谱条件下分别测定 8 只兔血浆中人参皂苷 R_{b1} 含量, 计算平均血药浓度, 结果见表 2。

将血药浓度-时间用 3P97 程序 (沈阳军区总医院提供) 进行曲线拟合, 处理结果表明, 静脉注射血塞通注射液后其体内分布符合静脉注射二室开放模型, 其药动学参数分别为: $V_c = 0.2707L$, $K_{12} = 0.4376 / \text{min}$, $K_{21} = 0.3812 / \text{min}$, $K_{10} = 0.0088 / \text{min}$, $T_{1/2\alpha} = 0.8417 / \text{min}$, $T_{1/2\beta} = 169.88 \text{ min}$, $\alpha = 0.8235 / \text{min}$, $\beta = 0.00408 / \text{min}$, $AUC = 67.067.79 \mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{min})$; $CL = 2.386 \text{ mL}/\text{min}$ 。

表 2 静脉注射血塞通注射液后不同时间平均人参皂苷 R_{b1} 血药浓度 (n=8)

时间 (min)	血药浓度 (μg/mL)	时间 (min)	血药浓度 (μg/mL)
0	0	120	162.32
3	295.73	180	130.19
5	271.80	240	104.20
10	260.77	300	82.30
20	249.42	360	64.38
30	237.09	420	52.43
60	218.78	480	33.73
90	191.55		

3 讨论

本实验采用 RP-HPLC 法测定兔血浆中人参皂苷 R_{b1} 的浓度, 从色谱图 (图 1) 可以看出, 人参皂苷 R_{b1} 有较强的色谱峰和较好的分离度, 血浆中杂质不干扰样品测定。

试验证明: 血浆中人参皂苷 R_{b1} 代谢缓慢。但采得血样后应立即处理, 并尽量在短时间内测定, 以减小测定结果的差异, 使结果更趋准确。

本试验在处理血浆样品时采用水浴法, 与有机溶剂法比较有以下优点: ①步骤简单, 一次提取, 直接进样; ②避免由于有机溶剂的引入而干扰人参皂苷 R_{b1} 的色谱峰, 减小误差; ③试验条件简单, 易于控制且无毒、廉价。但需要注意两点: 一是本法温度必须控制在 100℃; 二是在回收率和精密度试验过程中, 加水量与血浆体积比 ≥ 1 时, 分离效果不理想, 故采用水浴法时, 建议血浆量应占大部分, 以得到更好的分离效果。

血塞通注射液静脉注射后在兔体内药动学过程符合二室开放模型, $T_{1/2\alpha} = 0.8417 / \text{min}$ 和 $T_{1/2\beta} = 169.88 / \text{min}$ 说明该注射液在血中分布和消除过程较迟缓, 30 min 到 120 min 血药浓度下降幅度较小。故建议在临床给药时应注意给药次数及剂量。

(下转第 158 页)

叶,其煎煮时间较短。一般煮沸即可。主要考察煎煮时间过短的中药汤剂在贮存过程中质量的稳定性。pH 值为弱酸性。

2.4.2 B类具有止咳定喘,宣降肺气,清热化痰功效,主要用于治疗支气管哮喘,慢性支气管炎。处方组成为:蜜炙麻黄,苏子,蜜炙冬花,蜜炙甘草,杏仁,桑白皮,黄芩,法制半夏。其 pH 值为 6.0。选方目的:该类处方蜜炙类药物较多,含糖量较高,主要考察含蜜糖液较高的中药汤剂在贮存过程中其质量的稳定性。pH 值近中性偏酸。

2.4.3 C类具有疏风散热,行气止痛功效,处方组成为:柴胡,黄芩,清夏,蔓荆子,防风,白芷,川芎,香附,赤芍,白芍,枳壳,生甘草,山栀子。其 pH 值为 4.3。选方目的:主要考察含有黄芩等抑菌药物的中药汤剂在贮存过程中其质量的稳定性。pH 值为酸性。

2.4.4 D类具有养心安神,清热除烦功效,主要用于治疗神经衰弱。处方组成为:柏子仁,酸枣仁,远志,当归,川芎,党参,黄芪,茯苓,神曲,夜交藤,甘草。其 pH 值为 5.0。选方目的:主要考察含多味含油质的种子类药物组成的方剂其煎煮液在贮存过程中质量的稳定性。pH 值为弱酸性。

3 结果

3.1 4类中药煎煮液在 (25±5) °C 下检查结果。

3.2 4类中药煎煮液在 2~8 °C 下检查结果

3.3 阳性对照实验结果 在 4类中药煎煮液的供试液中大肠杆菌 [CMCC(B) 44102] 均能正常检出,结果见表 3。

表 3 4类中药煎煮液的阳性对照实验结果

培养基	供试液				阳性				阴性			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
MUG	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
靛基质	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
BL	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性

4 小结和讨论

(上接第 153 页)

由于本研究是在动物体内进行,有一定的局限性,故还须进一步研究健康人和患者体内的药动学。

参考文献:

- [1] 王旭, 郭国庆, 张小茜. HPLC 法测定进口西洋参中人参皂苷 Rb₁, Rg₁, Re 的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(6): 27.
- [2] 沈国芳, 吴永江. RP-HPLC 测定血栓通注射液 4 种皂苷的含量 [J]. 中国药志, 2003, 38(9): 698.

A 方煎煮时间为沸腾后煎煮 3 min, 此方煎煮液的卫生学检查结果较好。B 方煎煮时间为沸腾 20 min, 其处方组成中大多为蜜炙类中药, 这类中药因其在制作过程中, 含糖分较多, 容易被污染而长细菌和霉菌, 但是从此实验结果看来, 蜜炙类药物经过高温煎煮、封袋严密后, 其卫生状况比较理想, 放置的时间也较长。C 类中草药处方的煎煮时间为沸腾 30 min, 其中因含有抑菌药物黄芩等, 故在其 pH 值较低的情况下, 抑菌效果仍然很好。由表 1 和表 2 可以知道, A, B, C 类袋装煎煮液在 (25±5) °C 下可以保存 30 d 以上, 在 2~8 °C 时可保存 45 d 以上。D 类中药的煎煮时间为沸腾后中火煎煮 30 min, 因处方中含种子类药物柏子仁, 酸枣仁, 故处方煎出药液组成含油性物质较多, 在保存过程中油性液体极易产生细菌, 而给袋装药液的储存带来一定的影响。D 类中药在 (25±5) °C 下实验到第 5 d, 2~8 °C 下第 10 d 时各出现一块类似珊瑚样的物质, 直径约为 1.5 cm, 其它地方分布着一些细小的斑点, 类似芝麻样。开始怀疑为油斑, 观查 2 d 后, 大斑点长到约为 2 cm, 而细小斑点无太大变化, 此时怀疑为细菌。但是继续再观察 2 d 未见斑点再有太明显的扩大, 由于设备有限, 故未做进一步研究。将此结果定为细菌数, 根据试验结果, (25±5) °C 下第 10 d 细菌总数达到限度, 2~8 °C 低温下第 18 d 细菌总数基本达到限度。所以 D 类的袋装药液在 (25±5) °C 下暂定为保存 10 d, 2~8 °C 时保存为 15 d。由表 3 可知, 4 类袋装煎煮液采用的微生物限度检查方法是可行的。另外, 包装袋药液的质量控制标准与 pH 值关系不大, 而是以包装的严密性有着非常大的直接关系。

参考文献:

- [1] 马绪荣. 药品微生物检验手册 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2000: 92.
- [2] 中国药典 2000 年版. 二部 [S]. 附录, 2000: 92.
- [3] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 179~180.
- [4] 张莉, 黄熙, 王骊丽. 中药药动学血样预处理方法回顾与展望 [J]. 中草药, 2000, 31(10): 792.
- [5] 孔令东, 陈廉, 郭戎, 等. 升压灵注射液药代动力学研究 [J]. 中成药, 2000, 22(9): 601.
- [6] 黄熙. HPLC 直接测定阿魏酸钠-方剂血样预处理新方法 (1) [J]. 中草药, 1999, 30(3): 175.

收稿日期: 2007-02-09