



统计矩法评价养阴通脑颗粒各有效部位配伍在脑缺血再灌大鼠中的药动学变化

郭莹¹, 杨洁红¹, 张恒义², 傅旭春³, 张宇燕¹, 万海同^{1*}

(1. 浙江中医药大学 心脑血管病研究所, 浙江 杭州 310053;
2. 浙江大学 生物医学工程与仪器科学学院, 浙江 杭州 310027;
3. 浙江大学 城市学院 药物研究所, 浙江 杭州 310015)

[摘要] **目的:**应用总量统计矩法研究中药复方养阴通脑颗粒主要有效部位的不同配伍对主要活性成分药动学参数的影响。**方法:**以养阴通脑颗粒中的主要有效部位生物碱、黄酮、皂苷、挥发油的量作为配伍的质量控制标准,按正交试验法设计复方主要有效部位的配伍实验,在不同时间点上检测川芎嗪和葛根素的血药浓度,分别计算川芎嗪和葛根素在各配伍条件下的零阶矩和平均滞留时间,再计算葛根素和川芎嗪的总量零阶矩和总量平均滞留时间。应用正交分析法分析配伍对其药动学参数的影响。**结果:**黄酮对葛根素和川芎嗪的总量零阶矩影响最大,生物碱对葛根素和川芎嗪的总量平均滞留时间影响最大,皂苷对2个总量统计矩参数的影响都很小,而挥发油对2个总量统计矩参数的影响都较大,提示挥发油可能促进葛根素和川芎嗪在大鼠体内的代谢。**结论:**总量统计矩参数可用于指导中药复方的配伍研究。

[关键词] 养阴通脑颗粒;药物代谢动力学;总量统计矩;零阶矩(AUC);一阶矩(平均滞留时间,MRT);葛根素;川芎嗪

药物动力学研究是现代药物开发的重要环节。由于中药的成分复杂,各有效成分的作用途径、对机体的影响可能各不相同,而且它们之间也相互影响^[1-2],因此,采用传统的隔室模型研究中中药复方的药动学过程存在较大的困难。而对于多成分指标的中药复方,目前仍采用单一主要活性成分(效应)指标进行药物动力学研究,这与中药复方所体现的整体效应相悖^[3]。以统计矩分析为基础的非隔室分析法,以药-时曲线下面积为主要计算依据,不受数学模型的限制,适用面广,比较适合中药复方的药物动力学研究。

养阴通脑颗粒是浙江中医药大学基于养阴生津法治疗血瘀证的法则研制的治疗缺血性脑血管病的

一种中药复方。主要由川芎、黄芪和葛根等有益气活血通络作用的6味中药组成。本实验采用统计矩方法,对复方配伍正交实验中获得的葛根素和川芎嗪血药浓度曲线数据进行处理,评价配伍对养阴通脑颗粒药动学参数的影响。

1 材料

1.1 仪器与设备 岛津 LC-10AD 液相色谱仪(手动进样器,LC-10ADVP 泵,SPD-10AVP 检测器,phenomenex GEMINI C₁₈ 柱,4.6 mm × 150 mm,5 μm)、Millipore 超纯水仪、Mettler Toledo AG135 电子天平、Hettich Universal 32 高速离心机,3p97 软件等。

1.2 药品与试剂 葛根素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110752-200209);盐酸川芎嗪对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110817-200305);甲醇为市售色谱纯;安眠酮(上海集成制药厂);乙腈、对羟基苯甲酸、冰醋酸均为市售分析纯,水为超纯水;养阴通脑颗粒,批号 051015,主要有效部位由浙江大学化学系制备:生物碱(生物碱 53%,川芎嗪 20%)、黄酮(黄酮 80%,葛根素 56.7%)、皂苷(皂苷 72%,黄芪甲苷 25.5%)、挥发油(藁本内酯 35%)。

1.3 动物 老年清洁级 SD 大鼠,雄性,体重 320 ~ 360 g,鼠龄 10 ~ 12 周,由浙江省医学科学院动物中

[收稿日期] 2009-10-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30672652,30973933);2007年浙江省高层次医药卫生创新人才培养对象;浙江省自然科学基金项目(Y405171)

[通信作者] *万海同,教授,博士生导师,主要从事防治脑血管中药的分离分析和药效学药动学研究, Tel: (0571) 86613711, Fax: (0571) 86613712, E-mail: wanhaitong@zjtcmm.net

[作者简介] 郭莹,博士,讲师,主要从事防治脑血管中药的药效学药动学研究, Tel: (0571) 86613713, Fax: (0571) 86613712, E-mail: littlegy@163.com



心提供,动物合格证号 SYXK(浙)2003-0001。

2 方法与结果

2.1 脑缺血模型大鼠的制作 采用改良的 Pulsinelli 四血管法造模^[4]:以 10% 水合氯醛每 100 g 体重 0.4 mL 腹腔麻醉,大鼠俯卧位固定于手术台上,在第一颈椎水平做一正中切口,找到两侧翼小孔,直视下电凝,永久性闭塞双侧椎动脉。颈部皮肤侧切口,分离颈总动脉,用微动脉夹夹闭双侧颈总动脉,30 min 后进行再灌注。

2.2 分组与给药 将 SD 大鼠随机分为 9 个组,每组 8 只,将养阴通脑颗粒 4 个主要有效部位(黄酮、生物碱、皂苷、挥发油),及高、中、低 3 个剂量,按照正交试验法组成 4 因素 3 水平,见表 1,采用正交试验设计方法,组成用量配比不同的 9 个组合,并用生理盐水配成混悬液,再灌注同时灌胃给药。

表 1 因素水平 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$

水平	A 生物碱	B 黄酮	C 草苷	D 挥发油
1	20	50	50	5
2	40	100	100	10
3	60	150	150	15

2.3 血浆样本预处理 于给药后 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 360 min 从颈动脉取血 1.0 mL, 枸橼酸钠抗凝,离心后吸取上清获得血浆,同法以生理盐水灌胃得到空白血浆。用微量加样器吸取血浆 0.3 mL,置于 1.5 mL 离心试管中,以微量加样针准确加入内标液(对羟基苯甲酸 15 μL 和安眠酮 12 μL),电动涡旋器充分混匀 15 s,准确加入 0.9 mL 乙腈,涡旋混匀 2 min, 6 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清供川芎嗪测定用,另取上清氮气吹干,流动相溶解,1 万 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心,供葛根素测定用。

2.4 色谱条件 葛根素的色谱条件^[5]:流动相甲

表 2 给药 9 个组合后不同时间点川芎嗪的血药浓度($\bar{x} \pm s, n=8$)

No.	5 min	15 min	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min	360 min
1	0.023 9 \pm 0.003 3	0.014 6 \pm 0.001 9	0.023 1 \pm 0.003 0	0.059 3 \pm 0.007 8	0.013 1 \pm 0.001 5	0.036 6 \pm 0.004 8	0.013 0 \pm 0.001 4	0.012 5 \pm 0.001 0
2	0.012 4 \pm 0.001 0	0.013 4 \pm 0.001 3	0.022 6 \pm 0.003 0	0.058 9 \pm 0.007 7	0.069 5 \pm 0.009 1	0.030 5 \pm 0.004 0	0.014 6 \pm 0.001 9	0.023 5 \pm 0.003 1
3	0.027 6 \pm 0.003 6	0.037 0 \pm 0.004 9	0.073 4 \pm 0.009 6	0.055 8 \pm 0.007 3	0.105 4 \pm 0.013 8	0.043 5 \pm 0.005 7	0.032 6 \pm 0.004 3	0.012 6 \pm 0.001 7
4	0.027 4 \pm 0.003 6	0.111 4 \pm 0.014 6	0.122 4 \pm 0.016 1	0.029 1 \pm 0.003 8	0.184 2 \pm 0.024 2	0.088 1 \pm 0.011 6	0.043 4 \pm 0.005 7	0.012 3 \pm 0.001 0
5	0.032 9 \pm 0.004 3	0.025 7 \pm 0.003 4	0.143 2 \pm 0.018 8	0.152 0 \pm 0.019 9	0.065 0 \pm 0.008 5	0.085 8 \pm 0.011 3	0.025 5 \pm 0.003 3	0.043 5 \pm 0.005 7
6	0.036 7 \pm 0.004 8	0.108 4 \pm 0.014 2	0.209 7 \pm 0.027 5	0.053 4 \pm 0.007 0	0.079 1 \pm 0.010 4	0.054 8 \pm 0.007 2	0.013 1 \pm 0.001 2	0.014 2 \pm 0.001 3
7	0.041 4 \pm 0.005 4	0.152 5 \pm 0.020 0	0.271 9 \pm 0.035 7	0.055 9 \pm 0.007 3	0.105 4 \pm 0.013 8	0.053 2 \pm 0.007 0	0.029 1 \pm 0.003 8	0.013 7 \pm 0.001 3
8	0.021 7 \pm 0.002 8	0.119 8 \pm 0.015 7	0.107 4 \pm 0.014 1	0.015 7 \pm 0.002 1	0.026 6 \pm 0.003 5	0.014 0 \pm 0.001 8	0.012 1 \pm 0.000 9	0.012 3 \pm 0.000 9
9	0.056 5 \pm 0.007 4	0.440 5 \pm 0.057 8	0.288 0 \pm 0.037 8	0.098 3 \pm 0.012 9	0.307 0 \pm 0.040 3	0.153 5 \pm 0.020 1	0.087 3 \pm 0.011 5	0.039 1 \pm 0.005 1

醇-0.5% 乙酸水(28:72),phenomenex GEMINI C_{18} 柱(4.6 mm \times 150 mm,5 μm),柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,流速 1.0 mL \cdot min $^{-1}$,检测波长 248 nm。在此色谱条件下,脑缺血大鼠血浆中葛根素和内标物分离完全,空白血浆无干扰,样品中无其他物质的干扰。大鼠血浆中高、中、低浓度的平均回收率为 97.6%,RSD $<$ 10%;大鼠血浆中高、中、低浓度的日内精密度和日间精密度的符合率要求。将色谱图上葛根素和内标物对羟基苯甲酸的峰面积比值与其相对应的浓度值作线性回归,得到该色谱条件下的葛根素的线性回归方程为 $Y=1.009 6X-0.039 9, R^2=0.999 2$,葛根素在 0.025~3.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈良好的线性关系。以信噪比为 3 时测得的最低检测限为 0.02 ng,血浆中的最低检测浓度为 0.004 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

川芎嗪的色谱条件:流动相甲醇-水(55:45),phenomenex GEMINI C_{18} 柱(4.6 mm \times 150 mm,5 μm),柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,流速 1.0 mL \cdot min $^{-1}$,检测波长 279 nm。在此色谱条件下,脑缺血大鼠血浆中川芎嗪和内标物分离完全,空白血浆无干扰,样品中无其他物质的干扰。大鼠血浆中高、中、低浓度的平均回收率为 102.98%,RSD $<$ 10%;大鼠血浆中高、中、低浓度的日内精密度和日间精密度的符合率要求。将色谱图上川芎嗪和内标物的峰面积比值与其相对应的浓度值作线性回归,得到该色谱条件下的川芎嗪的线性回归方程 $Y=0.383 7X-0.004 6, R^2=0.999 9$,在 0.011~2.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 川芎嗪呈良好的线性关系。以信噪比为 3 时测得的最低检测限为 0.025 ng,血浆中的最低检测浓度为 0.005 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5 葛根素和川芎嗪血药浓度的测定 取 2.3 中给药后所获得的血浆,采用本实验中的色谱条件进行测定,葛根素的血药浓度已另文报道^[5],川芎嗪的血药浓度见表 2。



2.6 养阴通脑颗粒总量统计矩计算 首先根据各个时间点川芎嗪和葛根素的血药浓度测定值,分别计算各配伍组方下的川芎嗪、葛根素的药动学参数(零阶矩 AUC 和一阶矩即平均滞留时间 MRT),然后根据以下定义^[6]从川芎嗪和葛根素的药动学参数 AUC 和 MRT 计算养阴通脑颗粒总量零阶矩 AUC 和总量一阶矩即总量平均滞留时间 MRT。

$$AUC = \sum_{i=1}^n AUC_i$$

$$MRT = \frac{\sum_{i=1}^n MRT_i * AUC_i}{\sum_{i=1}^n AUC_i}$$

计算得到养阴通脑颗粒的总量统计矩列于表 3。

表 3 $L_9(3^4)$ 组成的 9 个组方结果分析

No.	AUC /mg · L ⁻¹ · min ⁻¹	MRT /min
1	492.5	68.99
2	465.4	51.53
3	697.0	63.14
4	389.1	63.58
5	583.8	134.5
6	482.4	79.89
7	456.5	83.24
8	633.7	116.8
9	836.1	193.5

3 讨论

统计矩原理为非房室模型分析方法,1969 年 Perl 等将统计矩原理用于评价剂型中药物在体内的溶解、释放与吸收,并进一步阐明了统计矩的概念^[7-8]。采用中药复方有效多成分的总量动力学参数才能较客观地描述中药复方整体的量变行为,克服诸模型的局限。

从表 3 所列葛根素和川芎嗪的总量零阶矩 AUC 可以求出不同水平的均值和极差,并得出养阴通脑颗粒 4 个有效部位的最优配伍为 $A_3B_3C_3D_1$,对总量零阶矩 AUC 的影响从大到小依次为:黄酮 > 挥发油 > 生物碱 > 皂苷。由于 AUC 中所包含的 2 种成分葛根素和川芎嗪分别来自黄酮和生物碱,因此黄酮和生物碱对 AUC 影响较大,而且其含量越高,AUC 值越大;皂苷的影响很小,其极差还不到均值

的 10%;挥发油对 AUC 影响较大,当养阴通脑颗粒中的挥发油含量较低时,AUC 值较大,可能是挥发油可以促进葛根素和川芎嗪在大鼠体内的代谢。

从表 3 所列葛根素和川芎嗪的总量一阶矩 MRT 可以求出不同水平的均值和极差,并得出养阴通脑颗粒 4 个有效部位的最优配伍为 $A_3B_3C_2D_1$,对总量一阶矩 MRT 的影响从大到小依次为:生物碱 > 挥发油 > 黄酮 > 皂苷。该结果与上述的总量零阶矩 AUC 的结果非常相似,主要区别是生物碱对 MRT 的影响比黄酮更大,可能是川芎嗪在大鼠体内的消除比葛根素慢所致。

本研究采用总量统计矩法对养阴通脑颗粒主要有效部位配伍后的正交试验数据进行分析,研究了不同配伍对总量统计矩的影响。结果显示复方的总量零阶矩受以葛根素为标识物的黄酮水平的影响最大,而总量平均滞留时间则受以川芎嗪为标识物的生物碱的影响最大。挥发油对总量统计矩的影响较大,提示挥发油可能促进葛根素和川芎嗪在大鼠体内的代谢。根据各水平的均值,推断出养阴通脑颗粒的最优配伍为 $A_3B_3D_1$ 组合,皂苷(黄芪甲苷)对总量统计矩的作用不大。应用总量统计矩参数对中药复方配伍研究具有一定的指导意义。

[参考文献]

- [1] 王阶,郭丽丽,王永炎. 中药方剂有效成(组)分配伍研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(1):5.
- [2] 王阶,王永炎,杨戈. 中药方剂配伍理论研究方法和模式[J]. 中国中药杂志,2005,30(1):6.
- [3] 向大雄,李焕德,胥新元. 中药复方药代动力学研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2002(1):61.
- [4] Pulsinelli W A, Brierley J B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat[J]. Stroke, 1979, 10(3): 267.
- [5] 郭莹,万海同,张莉,等. 不同中药复方有效部位组合对脑缺血大鼠血浆中葛根素代谢变化的研究[J]. 中国中药杂志, 2007,32(23):2531.
- [6] 贺福元 罗杰英 邓凯文. 中药复方动力学数学模型——总量统计矩法的研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2006, 8(6):13.
- [7] 魏树礼. 生物药剂学与药物动力学[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997:120.
- [8] Veng-pedersin. Noncompartmentally-based pharmacokinetics modeling[J]. Adv Deliv Rev, 2001, 48(2/3):265.



Value influence of different compatibilities of main active parts in Yangyintongnao granule on pharmacokinetics parameters in rats with cerebral ischemia reperfusion injury by total amount statistic moment method

GUO Ying¹, YANG Jiehong¹, ZNANG Hengyi², FU Xuchun², ZHNAG Yuyan¹, WAN Haitong^{1*}

(1. Institute of Cardio- Cerebrovascular Disease, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. College of Biomedical Engineering & Instrument Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;

3. Institute of Materia Medica, Zhejiang University City Collegy, Hangzhou 310015, China)

[**Abstract**] **Objective:** To study the influence of the different combinations of the main active parts in Yangyintongnao granule on the pharmacokinetics parameters of the two active components- ligustrazine and puerarin using the method of total amount statistic moment for pharmacokinetics. **Method:** Combinations were formed according to the dosages of the four active parts (alkaloid, flavone, saponin, naphtha) by orthogonal experiment $L_9(3^4)$. Blood concentrations of ligustrazine and puerarin were determined by HPLC at different time. Zero rank moment (AUC) and one rank moment (MRT, mean residence time) of ligustrazine and puerarin have been worked out to calculate the total amount statistic moment parameters was analyzed of Yangyintongnao granule by the method of the total amount statistic moment. The influence of different compatibilities on the pharmacokinetics parameters was analyzed by orthogonal test. **Result:** Flavone has the strongest effect than saponin on the total AUC. Ligustrazine has the strongest effect on the total MRT. Saponin has little effect on the two parameters, but naphtha has more effect on both of them. It indicates that naphtha may promote metabolism of ligustrazine and puerarin in rat. **Conclusion:** Total amount statistic moment parameters can be used to guide for compatibilities of TCM.

[**Key words**] Yangyintongnao granule; pharmacokinetics; total amount statistic moment; zero rank moment (AUC); one rank moment (MRT, mean residence time); puerarin; ligustrazine

doi: 10.4268/cjcm20100419

[责任编辑 张宁宁]