

耳聋左慈丸在大鼠体内的药代动力学

顾云双¹, 王瑞¹, 苏娜¹, 彭英¹, 阿基业¹, 王广基¹, 郑亦文², 孙建国^{1*}

(¹江苏省药代动力学重点实验室, 中国医学科学院“中药复杂组分PK-PD结合研究”创新单元, 中国药科大学, 南京 210009; ²新西兰奥塔哥大学生物医学学院药理毒理学系, 达尼丁 9054)

摘要 建立大鼠血浆中耳聋左慈丸中成分毛蕊花糖苷、氧化芍药苷、松果菊苷、苯甲酰芍药苷的共检测LC-MS/MS定量方法, 并运用此方法评价耳聋左慈丸在大鼠体内的药代动力学行为。采用甲醇作为蛋白沉淀剂, 用蛋白沉淀法处理血浆样本, 以甲醇为有机相, 0.1%甲酸水溶液为水相, 在负离子模式下对毛蕊花糖苷、氧化芍药苷、松果菊苷、苯甲酰芍药苷进行定量分析方法的建立, 并且对所建方法进行方法学考证。选取健康SD大鼠, 单次灌胃20 mL/kg(相当于原药10 g/kg剂量)的耳聋左慈丸提取液, 运用建立的方法测定在给药后不同时间间隔的待测物质血浆浓度, 并利用Phoenix WinNonlin 8.3软件经非房室模型拟合计算药代动力学参数。方法学验证结果表明, 毛蕊花糖苷($r = 0.9937$)、氧化芍药苷($r = 0.9946$)在0.5~50 ng/mL范围内线性良好, 松果菊苷($r = 0.9936$)、苯甲酰芍药苷($r = 0.9926$)在1~100 ng/mL范围内线性良好, 4种物质的批间及批内精密度的RSD均小于15%, 批间及批内准确度均在85%~115%之间。提取回收率、基质效应和稳定性均满足相关要求。在大鼠单次灌胃耳聋左慈丸提取液后, 4种待测物质都发生了较快的吸收和消除, 氧化芍药苷、松果菊苷、苯甲酰芍药苷的血药浓度-时间曲线中都出现双峰现象; 与其他3种物质相比, 氧化芍药苷在大鼠血浆中浓度较高, $c_{\max 1}$ 为(24.40 ± 4.78) ng/mL, $c_{\max 2}$ 为(22.50 ± 2.70) ng/mL。结果表明, 该方法的验证结果符合生物样本分析方法指导原则, 可用于评价耳聋左慈丸提取液在大鼠体内的药代动力学行为。

关键词 耳聋左慈丸; 毛蕊花糖苷; 氧化芍药苷; 松果菊苷; 苯甲酰芍药苷; 药代动力学; LC-MS/MS

中图分类号 R969 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2022)04-0481-09

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20220411

引用本文 顾云双, 王瑞, 苏娜, 等. 耳聋左慈丸在大鼠体内的药代动力学[J]. 中国药科大学学报, 2022, 53(4): 481 - 489.

Cite this article as: GU Yunshuang, WANG Rui, SU Na, et al. Pharmacokinetic study of Erlong Zuoci Pill in rats[J]. J China Pharm Univ, 2022, 53(4): 481 - 489.

Pharmacokinetic study of Erlong Zuoci Pill in rats

GU Yunshuang¹, WANG Rui¹, SU Na¹, PENG Ying¹, A Jiye¹, WANG Guangji¹, ZHENG Yiwen², SUN Jianguo^{1*}

¹Jiangsu Provincial Key Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Research Unit of PK-PD Based Bioactive Components and Pharmacodynamic Target Discovery of Natural Medicine of Chinese Academy of Medical Sciences, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; ²Department of Pharmacology and Toxicology, School of Biomedical Sciences, University of Otago, Dunedin 9054, New Zealand

Abstract To establish a quantitative LC-MS/MS method for the simultaneous detection of components of Erlong Zuoci Pill in rat plasma: verbascoside, oxypaeoniflorin, echinacoside and benzoylpaeoniflorin, and to evaluate the pharmacokinetic characteristics of Erlong Zuoci Pill in rats, plasma samples were purified by protein precipitation using methanol as a protein precipitant. Methanol was used as the organic phase and aqueous solution containing 0.1% formic acid was used as the water phase. The quantitative analysis method of verbascoside, oxypaeoniflorin, echinacoside and benzoylpaeoniflorin was established in negative ion mode, and the validation of bioanalytical method was carried out. Healthy SD rats were selected, and 20 mL/kg (equivalent to the original

收稿日期 2022-04-09 *通信作者 Tel: 13915990907 E-mail: jgsun@cpu.edu.cn

基金项目 国家重点研发计划“政府间国际科技创新合作”重点专项资助项目(No. 2017YFE0109600); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助项目(No. 2021-I2M-5-011)

drug 10 g/kg dose) of *Erlong Zuoci* Pill extract was administered by intragastric administration. The plasma concentration of the target compounds at different time intervals after administration was determined using the established method, and the pharmacokinetic parameters was calculated by the Phoenix WinNonlin 8.3 software using the non-compartmental model. The method validation results showed that verbascoside ($r = 0.9937$) and oxypaeoniflorin ($r = 0.9946$) had good linear relationship in the concentration range of 0.5–50 ng/mL, echinacoside ($r = 0.9936$) and benzoylpaeoniflorin ($r = 0.9926$) had good linear relationship in the concentration range of 1–100 ng/mL. The relative standard deviations of the inter- and intra- batch precision of the four compounds were all less than 15%, and the inter- batch and intra- accuracies were between 85% and 115%. Extraction recovery, matrix effect and stability met the relevant requirements. After a single gavage of *Erlong Zuoci* Pill extract in rats, all the four compounds were rapidly absorbed and eliminated. Oxypaeoniflorin, echinacoside, and benzoylpaeoniflorin showed two peaks in their drug concentration-time curves. Compared with the other three compounds, oxypaeoniflorin has the highest concentration in rat plasma with $c_{\max 1}$ of (24.40 ± 4.78) ng/mL and $c_{\max 2}$ of (22.50 ± 2.70) ng/mL. The results show that the validation results of this method are in line with the guiding principles of biological sample analysis methods, and it can be used to evaluate the pharmacokinetic characteristics of *Erlong Zuoci* Pill extract in rats.

Key words *Erlong Zuoci* Pill; verbascoside; oxypaeoniflorin; echinacoside; benzoylpaeoniflorin; pharmacokinetics; LC-MS/MS

This study was supported by the National Key R&D Program "Intergovernmental International Cooperation in Science and Technology Innovation" Key Special Funding Project (No. 2017YFE0109600) and the Innovation Fund for Medical Sciences of Chinese Academy of Medical Sciences (No. 2021-I2M-5-011)

耳鸣是一种常见的耳部听觉异常症状,其病因较多,机制复杂,目前临床主要采用糖皮质激素类药物^[1]、扩血管药物^[2]、中药^[3]、局部麻醉药^[4]、针刺^[5]、声治疗^[6-7]和认知行为疗法^[8]等进行干预治疗。耳聋左慈丸是治疗肾虚型耳鸣耳聋的经典名方,由熟地黄、山茱萸(制)、山药、茯苓、牡丹皮、竹叶柴胡、泽泻、磁石(煅)八味药材制成^[9]。有研究表明,耳聋左慈丸对老年性耳鸣^[10]、神经性耳鸣^[11]、药物所致耳鸣^[12]等多种耳鸣均具有治疗作用。但目前还没有关于耳聋左慈丸的定量研究。毛蕊花糖苷和松果菊苷是耳聋左慈丸的君药熟地黄中的主要成分,氧化芍药苷和苯甲酰芍药苷来源于牡丹皮,为研究其在体内的代谢行为,建立了耳聋左慈丸中毛蕊花糖苷、氧化芍药苷、松果菊苷、苯甲酰芍药苷的HPLC-MS/MS共检测定量分析方法并进行方法学验证。并以此方法评价大鼠血浆中4种物质的体内药代动力学行为,为后续耳聋左慈丸的体内研究提供参考。

1 材料

1.1 药品和试剂

毛蕊花糖苷对照品(批号:RH260383,分析对

照品)购自罗恩化学试剂;苯甲酰芍药苷对照品(批号:DST210410-053, HPLC \geq 98%)、氧化芍药苷对照品(批号:DST201113-074, HPLC \geq 98%)、松果菊苷对照品(批号:DSTDS003801, HPLC \geq 98%)购自成都德思特生物技术有限公司;耳聋左慈丸原料药粉末(批号:20210309)受赠于杭州胡庆余堂药业有限公司;甲酸(色谱纯)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;甲醇(梯度级)购自Merck公司;水为超纯水。

1.2 仪器

高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪(含日本岛津高效液相色谱系统LC-30AD;美国AB Sciex质谱系统API5000、电喷雾离子源及Analyst 1.5.1工作站);Thermo Sorvall Biofuge Stratos 台式低温高速离心机(美国赛默飞世尔公司);Eppendorf Mix-Mate 混匀小精灵、Eppendorf Minispin AG22331 台式离心机(德国艾本德公司);Vortex Mixer XW-80A 涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Milli-Q Gradient A1 超纯水机(美国密理博公司)。

1.3 动物

健康SD大鼠18只,雌雄兼用,日龄42~62 d,

购自浙江维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(浙)2019-0001。

2 方法

2.1 标准溶液的配制

分别精密称取毛蕊花糖苷、氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷、松果菊苷的标准品于 1.5 mL 离心管中,用甲醇溶解得到质量浓度为 10 mg/mL 的 4 份母液,将 4 份母液分别用甲醇稀释到 1 mg/mL。分别从质量浓度为 1 mg/mL 的母液中取苯甲酰芍药苷 100 μ L、松果菊苷 100 μ L、毛蕊花糖苷 50 μ L、氧化芍药苷 50 μ L 于同一离心管中,用甲醇补足至体积为 1 mL,得到苯甲酰芍药苷和松果菊苷质量浓度为 100 μ g/mL、毛蕊花糖苷、氧化芍药苷质量浓度为 50 μ g/mL 的混合储备液,取此混合储备液 100 μ L,加入甲醇 900 μ L,混匀后得到苯甲酰芍药苷和松果菊苷质量浓度为 10 μ g/mL、毛蕊花糖苷、

氧化芍药苷质量浓度为 5 μ g/mL 的工作液母液,存于 -20°C 备用。

2.2 色谱条件

色谱柱:Zorbax Eclipse Plus C₁₈(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μ m);柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;水相(A):超纯水(含 0.1% 甲酸);有机相(B):甲醇;流速:0.4 mL/min;分析时间:7 min;梯度洗脱:0 ~ 0.5 min 5%B,0.5 ~ 1 min 5% ~ 85%B;1 ~ 4.5 min 85%B;4.5 ~ 5 min 85% ~ 5%B;5 ~ 7 min 5%B。

2.3 质谱条件

选用电喷雾离子源,源参数如下:喷雾电压(IS)-4 500 V,辅助气 1(GS1)55 Arb,辅助气 2(GS2)55 Arb,辅助气加热温度(TEM)550 $^{\circ}\text{C}$,气帘气(CUR)40 Arb,碰撞气(CAD)6 Pa。

在负离子、MRM 模式下检测,设定 Q0 入口电压(EP)为 -10 V ,Q2 出口电压(CXP)为 -15 V ,用于定量的离子对相关质谱信息见表 1。

Table 1 Related parameters in MS analysis

Compd.	t_{R} /min	Precursor ion/(m/z)	Daughter ion/(m/z)	DP/V	CE/V
Verbascoside	1.93	623.2	161.2	-240	-44
Oxypaeoniflorin	1.87	495.1	137.1	-211	-42
Echinacoside	1.86	785.4	161.3	-263	-57
Benzoylpaeoniflorin	2.08	583.2	121.2	-150	-21
Warfarin(IS)	2.27	307.0	160.9	-200	-25

DP: Declustering potential; CE: Collision energy

2.4 血浆样品处理方法

取大鼠血浆 50 μ L,加入含华法林内标(1 ng/mL)的甲醇溶液 150 μ L,振荡 5 min,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下于 18 000 r/min 转速离心 5 min,转移上清液 130 μ L 至 1.5 mL 离心管中,再次在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 18 000 r/min 转速离心 5 min,取上清液 100 μ L 进样分析。

2.5 方法学考证

2.5.1 专属性和选择性 取空白 SD 大鼠,按 12 mL/kg 的剂量(相当于原药 6 g/kg 剂量)灌胃给予耳聋左慈丸原药粉末的生理盐水悬浊液,采集给药后 5 min 的眼眶血,置于含肝素的离心管中。在 8 000 r/min 的转速下离心 5 min,收集上清血浆。取血浆 50 μ L 按“2.4”项处理后进样分析,得专属性色谱图(图 1)。

取 6 份来源不同的 SD 大鼠空白血浆 50 μ L,按照“2.4”项处理后进样分析;取同样 6 份来源不同

的 SD 大鼠空白血浆 45 μ L,分别加入标曲定量下限处的工作液,得到含毛蕊花糖苷、氧化芍药苷质量浓度 0.5 ng/mL、苯甲酰芍药苷和松果菊苷质量浓度为 1 ng/mL 的加药血浆,同样按照“2.4”项处理后进样分析。

2.5.2 定量下限 取若干份 45 μ L 大鼠空白血浆,加入工作液 5 μ L,配制毛蕊花糖苷、氧化芍药苷质量浓度为 0.5 ng/mL,苯甲酰芍药苷和松果菊苷质量浓度为 1 ng/mL 的含药大鼠血浆,按“2.4”项下方法处理后进样分析($n = 5$)。根据当日随行标准曲线回算各样品中物质浓度,并求算 RSD 和 RE。

2.5.3 标准曲线 取“2.1”项下的工作液母液,用甲醇逐级稀释配制系列工作液。以空白 SD 大鼠的血浆作为基质,按如下方法配制标准曲线($n = 3$):取空白基质 45 μ L 若干份,依次分别加入

工作液 5 μL , 涡旋 30 s 混匀, 可得到毛蕊花糖苷和氧化芍药苷质量浓度为 50, 20, 10, 5, 2.5, 1, 0.5 ng/mL, 松果菊苷和苯甲酰芍药苷质量浓度为 100, 40, 20, 10, 5, 2, 1 ng/mL 的系列含药血浆样本, 而后按照“2.4”项的方法处理样品, 进样分析。以所测生物样品中的待测物质和内标峰面积的比值为因变量(y), 待测物质的血浆终浓度为自变量(x), 用最小二乘法(权重系数为 $1/x^2$)进行回归运算, 得到各物质的回归方程。

2.5.4 精密度和准确度 取若干份 45 μL 大鼠空白血浆, 加入工作液 5 μL , 配制毛蕊花糖苷、氧化芍药苷质量浓度为 0.5, 0.8, 8, 40 ng/mL, 松果菊苷、苯甲酰芍药苷质量浓度为 1, 1.6, 16, 80 ng/mL 的含药血浆, 平行 5 份, 按“2.4”项下方法处理后进样分析, 连续测定 3 个分析批, 每个分析批间隔大于 12 h, 根据每批随行血浆样品标准曲线计算样本中的物质浓度, 求算批间、批内准确度和批间、批内精密度。

2.5.5 基质效应和提取回收率 取 6 份来源不同的空白 SD 大鼠血浆, 按如下 3 种方式进行处置: 第 1 种处置方式, 取若干份 45 μL 空白大鼠血浆, 依次分别加入工作液 5 μL , 振荡 30 s, 配制成毛蕊花糖苷和氧化芍药苷血浆终浓度分别为 0.5 ng/mL、40.0 ng/mL, 松果菊苷和苯甲酰芍药苷血浆终浓度为 1 ng/mL、80.0 ng/mL 的含药血浆样本, 加入 3 倍体积的含内标的甲醇沉淀剂, 按“2.4”项下处理进样分析。第 2 种处置方式, 预先以 3 倍体积甲醇沉淀剂对 45 μL 的空白大鼠血浆沉淀蛋白处理后, 再加入工作液 5 μL , 振荡混匀, 随后按“2.4”项下方法两次离心处理后进样分析; 第 3 种, 用等量超纯水代替大鼠空白血浆, 依前述第 2 种处置方式, 平行操作并进样分析。

进样后第 1 种处置方式的样品平均峰面积与第 2 种处置方式的样品平均峰面积相比, 结果即为大鼠血浆中 4 种物质的提取回收率; 将第 2 种处置方式的样品平均峰面积与第 3 种处置方法进样后的样品平均峰面积相比, 得到大鼠血浆中 4 种物质的基质效应因子。同时还考察了基质因子的变异系数: 用第 2 种处置方式的 4 种样品和内标物质峰面积与第 3 种处置方式的样品和内标峰面积做比, 计算 4 种样品和内标物质的基质因子, 然后用 4 种

样品的基质因子与各自的内标基质因子相比, 得到经内标归一化后的基质因子。

2.5.6 稳定性 取若干份空白 SD 大鼠血浆 45 μL , 加入工作液 5 μL , 振荡 30 s 混匀, 配制成浓度 I (毛蕊花糖苷和氧化芍药苷终浓度为 0.5 ng/mL、松果菊苷和苯甲酰芍药苷终浓度为 1 ng/mL) 和浓度 II (毛蕊花糖苷和氧化芍药苷终浓度为 40 ng/mL、松果菊苷和苯甲酰芍药苷终浓度为 80 ng/mL) 的含药血浆, 平行 5 份, 将制备样品分别按照不同处置方法进行处置: 包括在室温下放置 8 h、超低温 ($-60\text{ }^{\circ}\text{C} \sim -80\text{ }^{\circ}\text{C}$) 冻存 30 d、超低温冷冻 ($-60\text{ }^{\circ}\text{C} \sim -80\text{ }^{\circ}\text{C}$) - 解冻 ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) 3 次循环, 每种考察条件下浓度 I 和 II 平行五份, 按“2.4”项下处理进样分析, 根据当日随行标准曲线对毛蕊花糖苷、氧化芍药苷、松果菊苷和苯甲酰芍药苷的含量进行回算。另外同样制备浓度 I 和浓度 II 的含药血浆, 平行 5 份, 按照“2.4”项下处理, 然后置于进样盘中 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 放置, 24 h 后进样, 并根据当日随行标准曲线回算各物质含量。

2.6 耳聋左慈丸单次给药后的药代动力学研究

2.6.1 制备给药提取液 称取耳聋左慈丸粉末 80 g, 加入超纯水 150 mL 及无水乙醇 10 mL, 超声提取 2 h, 提取后在 3 000 r/min 下离心 10 min, 取上清液于 18 000 r/min 再次离心 5 min, 转移出上清液用于给药。另取上清液 1 mL 使用 0.22 μm 滤膜过滤, 用超纯水稀释 100 倍, 取出稀释后的样品 50 μL 于 1.5 mL 离心管中, 加入含华法林内标 (1 ng/mL) 的甲醇沉淀剂 150 μL , 振荡 5 min 后, 于 18 000 r/min 离心 5 min, 取出上清液 130 μL , 再次在 18 000 r/min 下离心 5 min, 取上清液 100 μL 进样分析, 根据随行标准曲线计算各物质浓度。

2.6.2 实验方案 取空白雄性 SD 大鼠 4 只, 按 20 mL/kg (相当于原药 10 g/kg 剂量) 灌胃给予上述提取液。实验前 12 h 禁食不禁水, 采集给药后 0、5、10、20、40 min, 及 1、2、4、6、8 h 的大鼠眼眶静脉血, 置于含肝素的离心管中。在 8 000 r/min 的转速下离心 5 min, 收集上清血浆, 按“2.4”项方法处理后进样分析, 根据随行标曲进行浓度计算。将浓度结果导入 Phoenix WinNonlin 8.3 软件进行非房室模型拟合, 求算药代动力学参数。

3 结果

3.1 专属性和选择性

在空白基质中各物质的响应均低于空白血浆中各物质定量下限的 20%,并低于内标响应的

5%,表明 4 种物质在该方法下的保留情况不受血浆中内源物质的影响。毛蕊花糖苷、氧化芍药苷、松果菊苷、苯甲酰芍药苷和内标华法林的保留时间分别是 1.93、1.87、1.86、2.08、2.27 min。几种物质的特征性色谱图如图 1 所示。

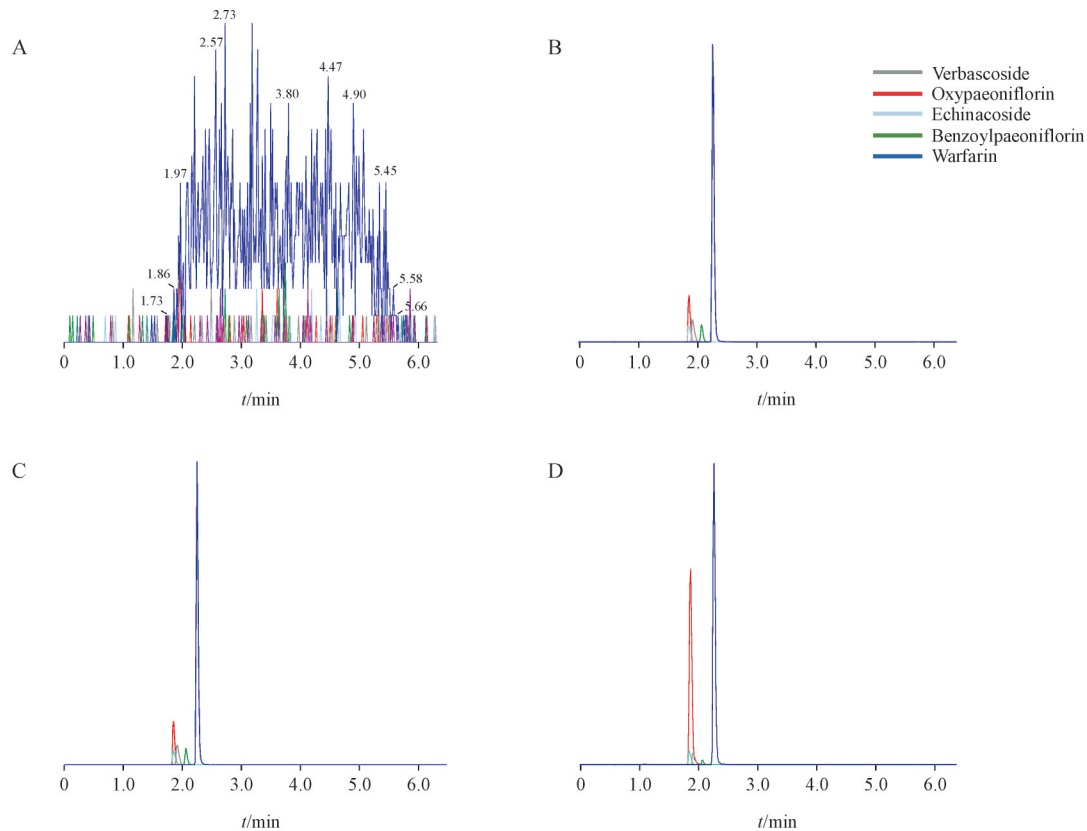


Figure 1 Characteristic chromatograms of verbascoside, oxypaeoniflorin, echinacoside, benzoylpaeoniflorin and warfarin (IS)

A: Blank plasma; B: Stock solution of standard references and IS ($c_{\text{Verbascoside}} = 10 \text{ ng/mL}$, $c_{\text{Oxypaeoniflorin}} = 10 \text{ ng/mL}$, $c_{\text{Echinacoside}} = 20 \text{ ng/mL}$, $c_{\text{Benzoylpaeoniflorin}} = 20 \text{ ng/mL}$, $c_{\text{Warfarin}} = 1 \text{ ng/mL}$); C: Standard references and IS treated with blank plasma ($c_{\text{Verbascoside}} = 10 \text{ ng/mL}$, $c_{\text{Oxypaeoniflorin}} = 10 \text{ ng/mL}$, $c_{\text{Echinacoside}} = 20 \text{ ng/mL}$, $c_{\text{Benzoylpaeoniflorin}} = 20 \text{ ng/mL}$, $c_{\text{Warfarin}} = 1 \text{ ng/mL}$); D: Plasma sample taken 5 mins after intragastric administration

3.2 定量下限

根据随行标曲计算浓度,计算 RSD 和 RE (相对偏差),毛蕊花糖苷、氧化芍药苷、松果菊苷、苯甲酰芍药苷在定量下限处的 RSD 依次为 3.8%、5.5%、4.3%、7.0%; RE 依次为 5.8%、5.7%、-1.5%、6.9%。符合生物样本分析的相关

标准。

3.3 标准曲线

毛蕊花糖苷、氧化芍药苷、松果菊苷、苯甲酰芍药苷的标准曲线如表 2 所示,结果表明各物质在线性范围内的线性良好($r > 0.99$),可满足于后续在此范围内的物质含量测定要求。

Table 2 Standard curves and linear ranges of verbascoside, oxypaeoniflorin, echinacoside and benzoylpaeoniflorin in rat plasma

Compd.	Equation	Linear range (ng/mL)	r
Verbascoside	$y = 0.0137x + 0.00114$	0.5–50	0.9937
Oxypaeoniflorin	$y = 0.0069x + 0.00185$	0.5–50	0.9946
Echinacoside	$y = 0.00912x + 0.000625$	1–100	0.9936
Benzoylpaeoniflorin	$y = 0.00692x + 0.00049$	1–100	0.9926

3.4 精密度和准确度

在定量下限和高、中、低浓度质控浓度下,毛蕊花糖苷的批内精密度 RSD 在 2.0% ~ 5.7% 之间,批间精密度为 6.3% ~ 7.2%; 氧化芍药苷的批内精密度为 3.3% ~ 7.0%,批间精密度为 6.2% ~ 9.0%; 松果菊苷的批内精密度为 3.9% ~ 6.6%,批

间精密度为 6.1% ~ 8.0%; 苯甲酰芍药苷的批内精密度为 2.2% ~ 5.7%,批间精密度为 5.0% ~ 8.5% 之间。4 种物质的批内、批间准确度也都在标示值的 $\pm 15%$ 之内,表明该方法具有良好的重复性和准确性,符合生物样本测定相关原则。

Table 3 Accuracies and precisions of verbascoside, oxypaeoniflorin, echinacoside and benzoylpaeoniflorin in rat plasma

Compd.	c/(ng/mL)	Precision RSD/%		Accuracy($\bar{x} \pm s, n = 5$)/%	
		Intra-batch	Inter-batch	Intra-batch	Inter-batch
Verbascoside	0.5	5.7	7.2	103.8 \pm 6.0	102.1 \pm 7.4
	0.8	4.2	6.6	105.3 \pm 4.4	99.6 \pm 6.5
	8.0	2.0	6.9	110.3 \pm 2.4	102.2 \pm 7.1
	40.0	3.8	6.3	103.6 \pm 3.9	97.9 \pm 6.2
Oxypaeoniflorin	0.5	7.0	9.0	110.5 \pm 7.9	101.3 \pm 9.2
	0.8	5.4	7.0	104.1 \pm 5.6	97.1 \pm 6.9
	8.0	6.7	7.0	107.8 \pm 7.3	100.9 \pm 7.2
	40.0	3.3	6.2	99.0 \pm 3.3	95.8 \pm 5.9
Echinacoside	1.0	4.8	8.0	104.3 \pm 5.0	99.5 \pm 7.8
	1.6	6.6	6.1	98.9 \pm 6.6	95.0 \pm 5.7
	16.0	4.7	7.8	108.7 \pm 5.1	100.3 \pm 7.7
	80.0	3.9	7.6	105.6 \pm 4.1	98.0 \pm 8.5
Benzoylpaeoniflorin	1.0	5.2	8.5	105.0 \pm 5.6	100.4 \pm 8.6
	1.6	4.7	5.0	95.9 \pm 4.5	97.0 \pm 4.8
	16.0	5.7	8.0	105.1 \pm 5.9	101.9 \pm 8.2
	80.0	2.2	5.2	95.0 \pm 2.1	93.9 \pm 4.9

3.5 基质效应与提取回收率

在高、低两个浓度下,毛蕊花糖苷、氧化芍药苷、松果菊苷和苯甲酰芍药苷的平均提取回收率内标归一化后的基质因子列于表4。结果表明这4种物质的基质效应的RSD均小于15%,基质效应和提取回收率均符合要求。

Table 4 Matrix effects and extraction recoveries of verbascoside, oxypaeoniflorin, echinacoside and benzoylpaeoniflorin in rat plasma

Compd.	c/(ng/mL)	Recovery/ %	Matrix effect	
			($\bar{x} \pm s, n = 6$)	RSD/%
Verbascoside	0.8	81.1	1.3 \pm 0.11	8.5
	40	81.5	1.3 \pm 0.05	4.2
Oxypaeoniflorin	0.8	90.7	1.8 \pm 0.20	11.2
	40	99.3	1.7 \pm 0.10	6.0
Echinacoside	1.6	74.7	1.6 \pm 0.18	10.9
	80	77.7	1.6 \pm 0.08	5.1
Benzoylpaeoniflorin	1.6	78.5	1.1 \pm 0.12	11.2
	80	79.7	1.1 \pm 0.06	5.4

3.6 稳定性

在考察的几种条件下,毛蕊花糖苷、氧化芍药苷、松果菊苷和苯甲酰芍药苷的低、高两种浓度的RE均小于15%,说明在室温放置8h、进样盘放置24h、以及超低温-80℃冻存30d和3次冻存冻融(-80℃~37℃)的条件下,4种物质都能够保持足够的储存稳定性,可以满足生物样本测定的要求,数据结果如表5所示。

3.7 单次给药后的药代动力学

将用于给药的提取液进样测定了浓度,其中毛蕊花糖苷质量浓度为32 $\mu\text{g/mL}$,氧化芍药苷质量浓度为46.3 $\mu\text{g/mL}$,松果菊苷质量浓度为23.3 $\mu\text{g/mL}$,苯甲酰芍药苷质量浓度为23.8 $\mu\text{g/mL}$ 。按照20 mL/kg的给药剂量换算后毛蕊花糖苷的实际给药浓度为640 $\mu\text{g/kg}$,氧化芍药苷、松果菊苷和苯甲酰芍药苷的实际给药浓度分别为926、466和476 $\mu\text{g/kg}$ 。

Table 5 Stabilities of verbascoside, oxypaeoniflorin, echinacoside and benzoylpaeoniflorin in rat plasma ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Compd.	<i>c</i> /(ng/mL)	Room temperature 8 h		Automatic (24 h)		Freeze (-70 °C for 30 d)		Freeze-thaw (three times)	
		RSD/%	RE/%	RSD/%	RE/%	RSD/%	RE/%	RSD/%	RE/%
Verbascoside	0.8	5.2	-3.0	4.1	-3.1	5.1	0.3	2.0	1.0
	40	3.2	-6.0	2.8	-0.8	3.4	1.7	3.2	1.3
Oxypaeoniflorin	0.8	5.8	5.3	6.3	2.6	4.9	7.6	3.1	10.1
	40	3.4	-2.4	3.0	-1.4	2.4	-2.6	1.4	-0.9
Echinacoside	1.6	4.6	-1.0	4.3	-2.3	7.3	4.4	5.5	0.4
	80	2.8	-6.1	4.9	-0.4	4.3	4.5	4.5	1.9
Benzoylpaeoniflorin	1.6	2.3	0.6	9.2	1.9	8.0	0.5	5.2	5.0
	80	2.6	-2.0	2.3	5.8	1.8	0.2	2.5	0.6

通过软件计算得到4种物质在大鼠体内的药代动力学参数,结果如表6所示。在给予耳聋左慈丸提取液后,氧化芍药苷在大鼠体内浓度较高, $c_{\max 1}$ 为(24.40 ± 4.78) ng/mL, $c_{\max 2}$ 为(22.50 ± 2.70) ng/mL;毛蕊花糖苷和松果菊苷在大鼠体内

消除较快,半衰期在1.8 h左右,苯甲酰芍药苷的半衰期在3 h左右。并且绘制了4种物质的血药浓度-时间曲线,如图2所示,毛蕊花糖苷在给药后6 min左右时达峰,而氧化芍药苷、松果菊苷、苯甲酰芍药苷均在给药后出现双峰现象。

Table 6 Pharmacokinetic parameters of verbascoside, oxypaeoniflorin, echinacoside and benzoylpaeoniflorin in rats after single-dose i. g administration ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Parameter	Verbascoside	Oxypaeoniflorin	Echinacoside	Benzoylpaeoniflorin
AUC _(0-t) /(ng/mL·h)	14.06 ± 2.24	88.32 ± 19.30	18.53 ± 2.53	11.88 ± 3.11
AUC _(0-∞) /(ng/mL·h)	15.55 ± 3.46	111.66 ± 14.19	21.48 ± 2.81	15.32 ± 1.89
$c_{\max 1}$ /(ng/mL)	6.14 ± 1.92	24.40 ± 4.78	4.71 ± 1.88	4.15 ± 1.84
$c_{\max 2}$ /(ng/mL)	/	22.50 ± 2.70	3.92 ± 1.00	3.51 ± 2.91
$t_{\max 1}$ /h	0.104 ± 0.036	0.083	0.083	0.083
$t_{\max 2}$ /h	/	0.667	0.667	0.667
$t_{1/2\alpha}$ /h	1.88 ± 0.52	2.63 ± 0.69	1.82 ± 0.15	3.04 ± 1.37
CL _z /F(L/h/kg)	42.91 ± 7.91	8.42 ± 0.99	22.07 ± 2.87	31.54 ± 3.79
V _z /F(L/kg)	111.36 ± 17.87	31.55 ± 8.06	74.26 ± 26.31	142.63 ± 78.63

4 讨论

4.1 耳聋左慈丸的提取方法

中药具有服用量大的特点,在动物给药时,直接研磨灌胃困难难以在合适的给药体积内保证给药剂量,需要进行提取,目前耳聋左慈丸常用的提取方式是高温煎煮^[13],但是高温会影响物质稳定性,导致提取后成分的组成和含量与原药出现差异。在本实验中,采用水醇混合超声提取,溶解范围更广泛,并且能保证某些热不稳定组分的含量不发生明显变化,使提取液的成分组成更接近原药的成分组成。

4.2 药代动力学行为分析

体内实验结果表明,大鼠在耳聋左慈丸提取

液灌胃给药后,毛蕊花糖苷、氧化芍药苷、松果菊苷、苯甲酰芍药苷均能够在体内迅速分布并进行快速消除,与文献报道相符^[14-17]。与其他3种物质相比,氧化芍药苷在大鼠血中的浓度较高。此外,氧化芍药苷、松果菊苷和苯甲酰芍药苷在给药后都出现了双峰,3种物质在给药后5 min就出现了1次吸收峰,随后在40 min左右出现第2次吸收峰,肠肝循环导致双峰需要更长时间,所以肠肝循环引起双峰的可能性不大。提取液在给药时为浊液,所以存在部分药物溶解在溶液中的现象,而这部分溶解形式的药物更易通过胃快速吸收,产生1次快速吸收相。因此推测与其在体内的吸收过程有关,由于吸收不均匀出现双峰。相关研究表明^[18-19]在灌胃给予氧化芍药苷和松果菊苷的溶

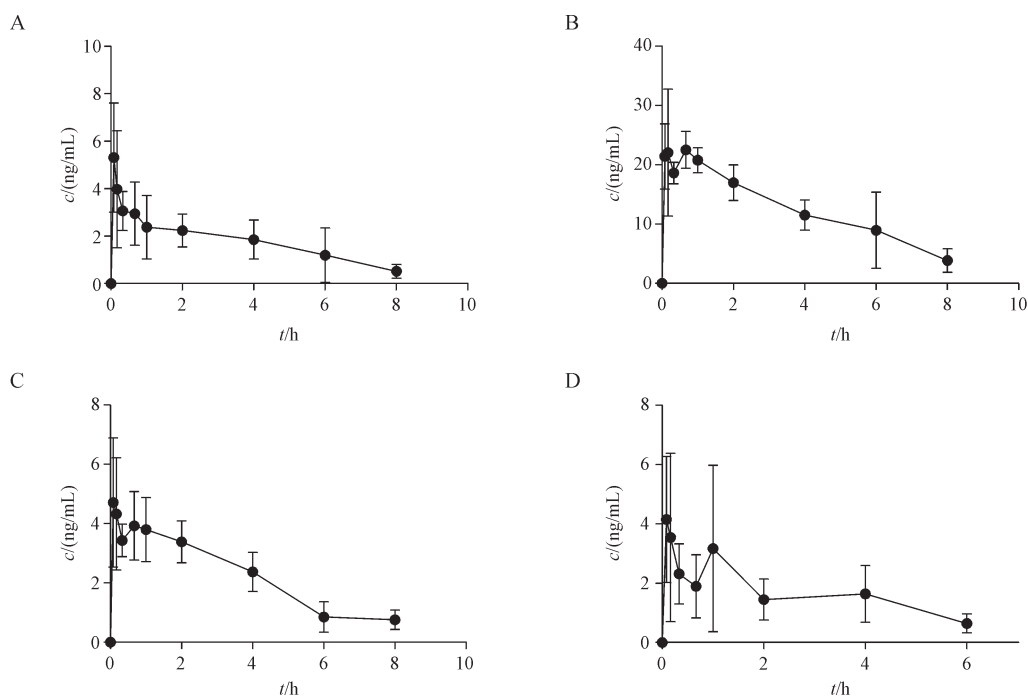


Figure 2 Plasma concentration-time curves of verbascoside (A), oxypaeoniflorin (B), echinacoside (C) and benzoylpaeoniflorin (D) ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

液时,均未出现双峰现象,而Zhou等^[20]在进行苯甲酰芍药苷的药代动力学研究时灌胃给予了苯甲酰芍药苷的混悬液,其中部分药物溶解,部分未溶解,给药后也出现了双峰现象,并且第1个吸收峰也是在给药5 min后出现的,与本实验结果相似,所以推测这种双峰现象是由于部分溶解的分子形式在灌胃后首先被胃迅速吸收,造成了5 min处的第1个吸收峰,而第2个吸收峰则是由未溶解部分的吸收产生的。

5 结论

耳聋左慈丸是治疗耳聋耳鸣的经典方,目前还未有耳聋左慈丸在体内的定量研究结果报道。本实验中对耳聋左慈丸进行了提取,并且首次建立了毛蕊花糖苷、氧化芍药苷、松果菊苷和苯甲酰芍药苷这4种物质在大鼠血浆中的LC-MS/MS共检测方法并用于评价耳聋左慈丸提取液在大鼠体内的药代动力学行为。此次实验结果可用于指导在相同的给药剂量下灌胃给予耳聋左慈丸提取液后毛蕊花糖苷、氧化芍药苷、松果菊苷和苯甲酰芍药苷在大鼠体内的药代动力学行为,但实验中毛蕊花糖苷、松果菊苷和苯甲酰芍药苷的浓度较低,可考虑在保证物质稳定性的前提下进一步优化提取方法,提高提取效率。

References

- [1] Ouyang J, Huang YW, Gao XW, *et al.* Effects of intratympanic injection for treatment of profound sudden hearing loss with persistent tinnitus[J]. *J Audiol Speech Pathol* (听力学及言语疾病杂志), 2018, **26**(4):347-349.
- [2] Zhang YB, Yue LY, Yin XY, *et al.* Effect of tinnitus treatment instrument combined with *Ginkgo biloba* extract on hearing and hemorheology in patients with sudden deafness and tinnitus[J]. *J Otolaryngol Ophthalmol Shandong Univ* (山东大学耳鼻喉眼学报), 2017, **31**(5):50-53, 61.
- [3] Fan XL, Chen Y, Li L, *et al.* Efficacy of Chinese herb *Cistanche Yishen* granules in treatment of tinnitus for patients with chronic nephritis[J]. *J Cell Biochem*, 2019, **120**(4):5505-5509.
- [4] Huang Y, Fu M. Therapeutic effects of postauricular injection of lidocaine in tinnitus [J]. *J Clin Otorhinolaryngol Head Neck Surg* (临床耳鼻咽喉头颈外科杂志), 2018(15):1139-1142.
- [5] Pang P, Shi YC, Xu HC, *et al.* Acupuncture methods put to the test for a tinnitus study: a Bayesian analysis [J]. *Complement Ther Med*, 2019, **42**:205-213.
- [6] Xu P, Yang JY, Lin QP, *et al.* Factors affecting the efficacy of precision sound therapy in tinnitus treatment [J]. *J Audiol Speech Pathol* (听力学及言语疾病杂志), 2021, **29**(06):653-657.
- [7] Li XX, Gu CL, Ma YM. Effect of tinnitus consultation combined with multiple compound acoustic therapy on patients with chronic primary [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg* (中国耳鼻咽喉颅底外科杂志), 2020, **26**(5):507-511.

- [8] Tang DM, Li HW, Chen L. Advances in understanding, diagnosis, and treatment of tinnitus [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, **1130**:109-128.
- [9] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia*: part 1 (中华人民共和国药典:一部)[S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020:865.
- [10] Wu Y, Wang Z, Ma XD, et al. Effect of *Erlong Zuoci* pill on expression levels of cAMP and PKA in tissue of mice with presbycusis [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2017, **35**(6):1548-1551.
- [11] Xie J, Zheng TH. Effect of *Erlongzuoci* pill and *Fucong Tongmai Kaiqiao* acupuncture in treating nervous deafness and tinnitus and its influence on serum NO and Connexin 26 [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med* (现代中西医结合杂志), 2017, **26**(33):3671-3673.
- [12] Wang J, Guo CR, Dong Y, et al. Effects of *Erlong Zuoci* pills and its effective disassembled prescriptions on gentamycin induced hair cell apoptosis [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, **35**(18):2464-2468.
- [13] Gong YC, Li N, Wang YR, et al. Effects of *Erlong Zuoci* Pills on autophagy and apoptosis of HEI-OC1 cells by regulating miR-34a [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2022, **37**(2):740-744.
- [14] Huo SX, Li JM, Gao L, et al. Absorption, distribution and excretion of acteoside in rats [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2016, **36**(6):450-454.
- [15] Hu Y, Gao JX, Ji Z, et al. Pharmacokinetics of four active estrogenic constituents in total glucosides of *Cistanche deserticola* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2021, **43**(8):1988-1994.
- [16] Chen XZ, Ma HL, Ding LQ, et al. Simultaneous determination of main monoterpenoids in radix paeoniae rubra extract by UPLC-MS/MS method and analysis of their pharmacokinetics in plasma of rats [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med* (辽宁中医杂志) 2018, **45**(3):590-595.
- [17] Cheng YS, Peng C, Wen FY, et al. Pharmacokinetic comparisons of typical constituents in white peony root and sulfur fumigated white peony root after oral administration to mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, **129**(2):167-173.
- [18] Shen JY, Yang XL, Yang ZL, et al. Enhancement of absorption and bioavailability of echinacoside by verapamil or clove oil [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, **9**:4685-4693.
- [19] Feng C, Liu M, Shi XW, et al. Pharmacokinetic properties of paeoniflorin, albiflorin and oxypaeoniflorin after oral gavage of extracts of *Radix Paeoniae Rubra* and *Radix Paeoniae Alba* in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, **130**(2):407-413.
- [20] Zhou XW, Bao ZZ. A pharmacokinetic study of benzoyl paeoniflorin in rats [J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med* (江苏中医药), 2019, **51**(2):80-82.

· 征订启事 ·

欢迎订阅 2022 年《中国药科大学学报》

《中国药科大学学报》是由国家教育部主管、中国药科大学主办的药学中文核心期刊,主要刊登合成药物化学、天然药物化学、生药学、中药学、药剂学、药物分析、药代动力学、药物生物技术、药理学、药事管理等学科的原创新研究论著。

《中国药科大学学报》在药学界享有较高的学术声誉,目前已被国际上多家著名权威数据库(CA, IPA, SCOPUS, JST, IC, EMBASE/Excerpta Medica, CAS)等所收录,被国内权威数据库《中文核心期刊要目总览》(2020年版)、中国科学引文核心数据库(CSCD核心)、中国科技论文统计源数据库等列为药学类核心期刊,屡获原国家新闻出版总署、教育部、科技部等各种优秀期刊奖。

2020年,《中国药科大学学报》被评为中国高校百佳科技期刊,2021年被评为华东地区优秀期刊。根据中国知网《中国学术期刊影响因子年报》的数据显示:《中国药科大学学报》2021年最新复合影响因子突破1,达到1.137,在药学期刊界的学术声誉和影响力持续不断攀升,在高等院校、科研机构、制药企业、医院等单位拥有众多读者。

本刊为双月刊,128页。国际标准开本,国内外公开发行。欢迎到当地邮局订阅,漏订者可直接与编辑部联系。

国内刊号:CN 32-1157/R

ISSN:1000-5048

国内邮发代号:28-115

定价:40元/期,全年240元

地址:南京市童家巷24号

邮政编码:210009

电话:025-83271566

传真:025-83271279

E-mail: xuebao@cpu.edu.cn

http://www.zgykdxxb.cn