

以人参皂苷 Re 为 Marker 的参麦注射液 Beagle 犬毒代动力学研究

寿巧惠¹ 顾利强² 张升^{2*}

1.杭州医学院药学院 杭州 310013; 2.杭州医学院安全性评价研究中心 杭州 310013

【摘要】目的 研究参麦注射液在 Beagle 犬体内的毒代动力学。方法 选用人参皂苷 Re 作为检测指标 (Marker), 利用 LC-MS 法进行参麦注射液 Beagle 犬毒代动力学研究。18 条 Beagle 犬随机分成高、中、低剂量组, 静脉滴注分别给予 20000, 6000, 2000 mg/kg (按生药量计算) 参麦注射液, 连续给药 6 个月, 分别于给药第 1, 90 和 180 d 进行毒代动力学采样, 经 LC-MS 检测人参皂苷 Re 含量, 计算药代动力学参数, 并对曲线下面积 ($AUC_{(0-t)}$) 最大血药浓度 (C_{max}) 进行统计分析; 结果 人参皂苷 Re 的最大血药浓度可达 34742 ng/mL, 但迅速下降, 在给药结束后 6 小时降至定量下限水平, 平均滞留时间 ($MRT_{(0-t)}$) 为 60–80 min; 3 个监测点各个剂量组人参皂苷 Re 的药代动力学参数 $AUC_{(0-t)}$ 和 C_{max} 均无性别差异, 但同一监测点不同剂量组间人参皂苷 Re 的药代动力学参数 $AUC_{(0-t)}$ 和 C_{max} 在 3 个监测点均有显著差异 ($P < 0.05$), 且每个监测点 $AUC_{(0-t)}$ 与剂量存在良好的线性关系 ($r > 0.9928$); 与给药第 1 天相比, 给药 90 天及给药 180 天各个剂量组 $AUC_{(0-t)}$ 和 C_{max} 显著增加 ($P < 0.05$, 低剂量组第 1 天与第 180 天间的 C_{max} 除外), 而第 90 天与第 180 天相比, 各个剂量组不同检测点间 $AUC_{(0-t)}$ 和 C_{max} 均无显著差异 ($P > 0.05$)。结论 参麦注射液中人参皂苷 Re 在 Beagle 犬体内 2000–20000 mg/kg 剂量范围内呈线性代谢, 且给药 3 个月及 6 个月后仍保持线性代谢方式; 参麦注射液中人参皂苷 Re 在各个剂量组在给药 3 个月范围内有蓄积现象, 而系统暴露于给药 3 个月至 6 个月范围内达到稳态。

【关键词】人参皂苷 Re, 参麦注射液, 液质联用, 毒代动力学

中国图书分类号: R99

文献标识码: A

Study on the Toxicokinetics of Shenmai Injection with Ginsenoside Re as Marker in Beagle Dogs

Abstract: Objective To study the toxicokinetics of ginsenoside Re in Beagle dogs; Methods Ginsenoside Re was selected as the marker and the toxicokinetics of ginsenoside Re in Beagle dogs was studied by LC-MS. 18 dogs were randomly divided into high, medium and low dose groups and given 20, 000, 6, 000 and 2, 000 mg/kg of ginsenoside Re by intravenous infusion for 6 months, respectively. Results The maximum blood concentration (C_{max}) of ginsenoside Re could reach 34742 ng/kg by LC-MS. The mean retention time ($MRT_{(0-t)}$) was 60–80 min; the pharmacokinetic parameters $AUC_{(0-t)}$ and C_{max} of ginsenoside Re in each dose group at the three monitoring sites did not differ by gender, but the pharmacokinetic parameters $AUC_{(0-t)}$ and C_{max} of ginsenoside Re in different dose groups at the same monitoring site did not differ by gender. The pharmacokinetic parameters $AUC_{(0-t)}$ and C_{max} of ginsenoside Re were significantly different among the three monitoring sites ($P < 0.05$), and there was a good linear relationship between $AUC_{(0-t)}$ and dose at each monitoring site ($r > 0.9928$); $AUC_{(0-t)}$ and C_{max} increased significantly in each dose group on day 90 and day 180 compared with day 1 of administration ($P < 0.05$, $p < 0.05$). The $AUC_{(0-t)}$ and C_{max} of each dose group increased significantly ($P < 0.05$), while there was no significant difference in $AUC_{(0-t)}$ and C_{max} between different testing points in each dose group on day 90 compared with day 180 ($P > 0.05$). CONCLUSIONS Ginsenoside Re in ginseng injection was linearly metabolized in Beagle dogs in the dose range of 2000–20000 mg/kg and remained linearly metabolized after 3 and 6 months of administration; ginsenoside Re in ginseng injection accumulated in all dose groups in the range of 3 months of administration, while systemic exposure reached steady state in the range of 3 to 6 months of administration.

Key words: Ginsenoside Re; Shenmai injection; LC-MS; Toxicokinetics

参麦注射液组方源自《千金要方》之生脉散, 为生脉散的衍变方, 由人参、麦冬两味药组成, 是一种治疗心脏病急症的中药制剂^[1]。随着现代药理学研究的发展, 更多的参麦注射液的药效被发现。通过网络药理学研究, 可以推测参麦注射液在调节免疫、抗病毒等方面可以实现对 COVID-19 以及冠心病的治疗^[2]。近几年, 随着 GLP (Good Laboratory Practice) 的发展和安全性评价技术的进步, 出于安全性和规范性的考虑,

中国将中药注射剂再评价工作提上日程。在分析技术与分析仪器的迅猛发展下, 有较多学者对参麦注射液的成分进行了研究^[3-4]。具有代表性的是多组分药代动力学与毒代动力学研究^[5]。然而, 未从游离药物的角度对参麦注射液的有效成分进行研究。本文利用固相萃取小柱, 对给予参麦注射液后犬体内的游离型人参皂苷 Re 进行了含量测定, 并以此对参麦注射液 Beagle 犬毒代动力学进行了研究。

1. 材料和方法

1.1 仪器、药品及试剂TSQ Quantum Access三重四极杆液质联用仪,

美国Thermo Fisher公司; Milli-Q超纯水仪, 美国Thermo Fisher公司; 离心浓缩仪, 美国LABCONCO公司; Anke-16G 离心机, 上海安亭科学仪器厂; AW-120电子天平, 日本岛津公司; 固相萃取仪, PEP-SPE小柱 (30 mg 填料), 北京艾杰尔科技有限公司。对照品: 供含量测试用人参皂苷Re对照品, 中国药品生物制品鉴定所提供, 批号110754-200421; 非那西丁 (内标), 中国药品生物制品鉴定所提供, 批号100095-198904。参麦注射液: 规格: 10 ml/支和100 ml/瓶, 批号分别为0904023和0907233, 每ml含2 g生药 (1g红参和1g麦冬) 及50 mg吐温, 由正大青春宝药业有限公司提供。5%葡萄糖注射液: 批号: 080114 1T, 规格: 100 ml/瓶, 由安徽双鹤药业有限责任公司提供。甲醇为色谱纯, 由Tedia公司提供; 水为实验室Milli-Q超纯水仪自制。

1.2 动物及实验 Beagle犬, 普通级, 年龄4-6月龄, 体重5.0~7.0 kg,

18只, 雌雄各半, 由嘉兴市嘉安实验动物养殖有限公司供应, 实验动物生产许可证号: SCXK (浙) 2003-2007。犬饲养于不锈钢犬笼内, 每笼1只, 每天上下午定量喂饲全价营养颗粒饲料, 自由饮水, 饲养室温、湿度由中央空调系统控制, 实验动物使用许可证号: SYXK (浙) 2007-0097。

18条犬随机分成3组, 即高、中、低三个剂量组, 每组6只, 根据急性毒性试验结果, 静脉滴注给予为20000, 6000和2000 mg/kg参麦注射液 (按生药计)。给药速度2-3 mL/min, 给药容量10 mL/kg, 给药频率每周6天, 给药180天。毒代动力学研究采样分别安排于给药的第1天, 第90天, 第180天, 试验前所有犬均禁食不禁水。试验时以犬的前肢的头静脉给药, 于另侧前肢头静脉采血, 采样时间点分别为: 给药前 (0时), 给药期间10, 30 min, 给药结束 (60 min), 给药后10, 30, 60, 90, 120, 240, 360 min。在各时间点采血约1.2 mL, 3000 g离心10 min, 分离血浆0.5 mL保存于-80℃冰箱。

1.3 代谢动力学研究 色谱条件: 色谱柱: Thermo BDS HYPERSIL C18柱 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm); 柱温: 40℃; 流动相: 甲醇: 醋酸铵缓冲液 (10 mmol/L, pH=5) =70: 30 (v: v), 流速: 0.2 mL/min; 进样量: 10 μL; 质谱检测器。

质谱条件: Spray Voltage: 3500 V, Sheath Gas Pressure: 35, Ion Sweep Gas Pressure: 0.0, Aux Gas Pressure: 5, Capillary Temperature: 300 °C, Tube Lenz Offset: 128, Skimmer Offset: 0, Collision Pressure: 1.0, Collision Energy: $m/z[M-H]^+$: 180.0→110.1, 20 V, $m/z[M-H]^+$: 969.5→789.1, 43 V, $m/z[M-H]^+$: 969.5→348.6, 50 V; 正离子方式检测, 扫描方式: 人参皂苷Re和内标非那西丁均采用选择反应监测模式 (SRM), 用于定量的离子分别为 $m/z[M-H]^+$: 969.5→789.1与180.0→110.1; 人参皂苷Re同时监测子离

子 $m/z[M-H]^+$: 969.5→348.6, 用于排除实际样品的假阳性现象 (实际样品中含有 $m/z[M-H]^+$: 969.5→789.1的假阳性成分, 出峰时间为10 min左右)。

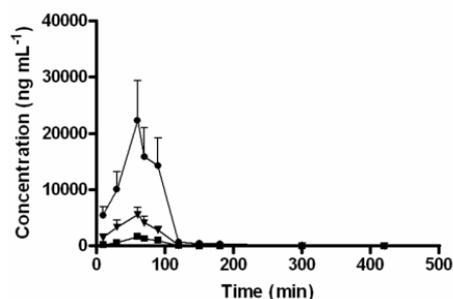
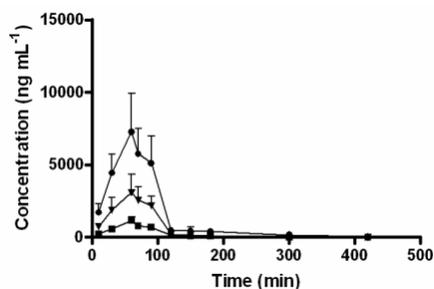
样品处理: 0.5 mL犬血浆, 加入0.5 mL醋酸铵缓冲液 (10 mmol/L, pH=5), 经15000 rpm离心5 min后取上清加入PEP-SPE小柱, PEP-SPE小柱事先以1 mL甲醇活化, 并以1 mL水清洗, 弃滤液。调节负压使达到约1 mL/min流速, 待上清液基本通过SPE小柱后, 再以1 mL水清洗小柱, 弃滤液。增加负压除去滤液后, 用1 mL甲醇洗脱, 收集洗脱液并置于离心浓缩仪内挥干溶剂。用200 μL流动相溶解, 漩涡震荡2 min, 15000 rpm离心5 min两次, 取上清液进质谱仪分析。

分析方法遵循“化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则”关于生物样品分析方法验证的要求, 并通过特异性、线性、准确度、精密度、灵敏度、回收率等指标验证。本方法条件下, 人参皂苷Re与内标非那西丁的保留时间分别为2.17与2.39 min。

2. 结果

参麦注射液长期给药180天后无死亡个体出现, 雌雄个体在各个指标均无显著差异, 但高剂量组犬与其他剂量组相比体重在第25周、第26周出现下降 ($P < 0.05$)。人参皂苷Re的最大血药浓度可达34742 ng/mL, 但迅速下降, 在给药结束后6小时降至定量下限水平。血药浓度数据经DAS软件 (Drug And Statistic, 2.1.1版本) 计算得药代动力学参数, 房室模型参数结果显示人参皂苷Re在Beagle犬体内消除方式最符合三室模型。非房室模型参数结果中的曲线下面积 ($AUC_{(0-t)}$) 和最大血药浓度 (C_{max}) 用于统计分析。

各个剂量组3个检测点的人参皂苷Re平均血药浓度-时间曲线如图1所示, 由图可知人参皂苷Re消除迅速, 平均滞留时间 $MRT_{(0-t)}$ 为60 - 80 min。



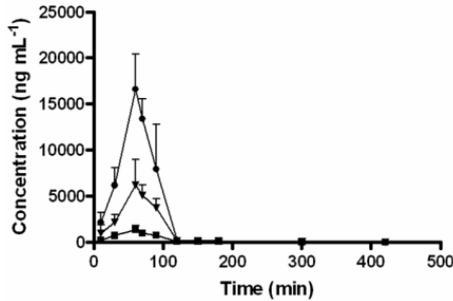


图1 给药第1天、第90天、第180天各剂量组人参皂苷Re平均血药浓度-时间曲线图

(■: 2000 mg/kg, ▼: 6000 mg/kg, ●: 20000 mg/kg, n = 6)

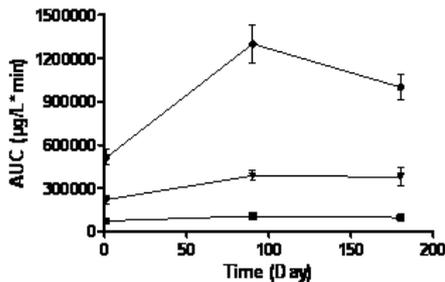


图2 各剂量组人参皂苷Re平均AUC₍₀₋₄₎-时间图

(■: 2000 mg/kg, ▼: 6000 mg/kg, ●: 20000 mg/kg, n = 6)

将非房室模型参数结果分别进行性别间、组别间和监测点间的统计检验 (T检验), 结果见表1。统计分析结果表明, 3个监测点各个剂量组

人参皂苷Re的药代动力学参数AUC₍₀₋₄₎和C_{max}均无性别差异, 但同一监测点不同剂量组间人参皂苷Re的药代动力学参数AUC₍₀₋₄₎和C_{max}在3个监测点均有显著差异 (P < 0.05), 且每个监测点AUC₍₀₋₄₎与剂量存在良好的线性关系 (r > 0.9928, 图3), 说明在2000 - 20000 mg/kg剂量范围内, 参麦注射液中人参皂苷Re在Beagle犬体内呈线性代谢; 不同检测点间非房室模型参数统计分析结果表明, 与给药第1天相比, 给药90天及给药180天各个剂量组AUC₍₀₋₄₎和C_{max}均显著增加 (P < 0.05, 低剂量组第1天与第180天间的C_{max}除外), 说明参麦注射液中人参皂苷Re各个剂量组在给药3个月范围内有蓄积现象, 而第90天与第180天相比, 各个剂量组不同检测点间AUC₍₀₋₄₎和C_{max}均无显著差异 (P > 0.05), 说明参麦注射液中人参皂苷Re系统暴露 (AUC₍₀₋₄₎) 在给药3个月至6个月范围内达到稳态 (图2)。

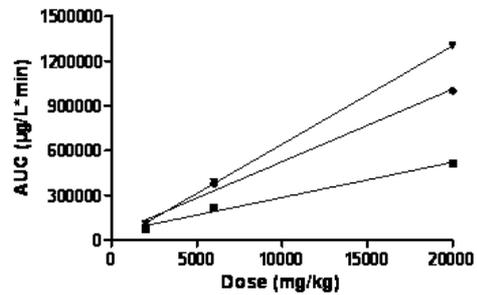


图3 各监测点人参皂苷Re平均AUC₍₀₋₄₎-剂量图

(■: 2000 mg/kg, ▼: 6000 mg/kg, ●: 20000 mg/kg, n = 6)

表1 Beagle犬静脉滴注不同剂量参麦注射液后人参皂苷Re的主要药代动力学参数 (mean ± SD, n=6)

PK parameters	Day 1st			Day 90th			Day 180th		
	2000 mg/kg	6000 mg/kg	20000 mg/kg	2000 mg/kg	6000 mg/kg	20000 mg/kg	2000 mg/kg	6000 mg/kg	20000 mg/kg
AUC ₍₀₋₄₎ (μg/L·min)	72752 ± 7538	219556 ± 66884*	513517 ± 129803*#	106719 ± 20047*	386578 ± 87023*※	1298886 ± 326246*#※	97007 ± 19409*	377353 ± 123675*※	999984 ± 175945*#※
C _{max} (μg/L)	1170.6 ± 203.7	3086.1 ± 1134.8*	7358.3 ± 2540.4*#	1677.8 ± 444.0*	5554.4 ± 1257.5*※	22276.2 ± 7025.6*#※	1351.0 ± 396.2	6248.9 ± 2675.7*※	16616.4 ± 3782.8*#※
MRT ₍₀₋₄₎ (min)	70.6 ± 5.5	69.5 ± 6.8	78.7 ± 6.2*#	74.1 ± 5.0	65.0 ± 4.1*	60.8 ± 2.8*※	77.3 ± 10.0	70.0 ± 3.7	68.9 ± 2.7*§

注: *, 与2000 mg/kg剂量组相比P < 0.05; #, 与6000 mg/kg剂量组相比P < 0.05; ※, 与给药第1天剂量组相比P < 0.05; §, 与给药第90天剂量组相比P < 0.05。

3. 讨论

中药制剂成分复杂, 因中药制剂各种成分与其主要适应症无法一一对应, 难于选择合适的Marker, 故中药制剂的质量标准制订异常困难。此前, 限于技术等原因, 中药制剂的质量标准一般选取制剂中的一种典型活性成分作为Marker, 故存在Marker单一, 无法完全代表整个制剂质量的

问题, 如何选择具有代表性的Marker对中药制剂进行质量控制是目前研究与探讨热点。同样, 中药制剂的药代动力学与毒代动力学研究也存在难于选择Marker的问题。针对Marker单一的问题, 有专家提出选取制剂中多个具有代表性的药理活性成分作为Marker^[6], 但在Marker如何选择、Marker选择的数量、Marker间的权重系数如何分配等问题上尚无统一意见, 值得

进一步探讨研究。

作为一个复方中药制剂, 参麦注射液成分非常复杂, 包括来源于人参的人参皂苷Rg1, Re, Rb1, Rb2, Rc和Rd等和来源于麦冬的麦冬皂苷等^[6]。人参皂苷Re是参麦注射液的主要成分之一, 具有免疫调节、抗疲劳、血管舒张等活性^[8]。近年来, 有较多的研究表明, 人参皂苷Re对于心肌梗死^[9]、心肌缺血再灌注损伤^[9]、心肌细胞损伤凋亡^[10]、心律失常^[11]等心脏疾病具有显著的心肌保护作用 and 拮抗作用, 与参麦注射液的主要适应症相符, 因此人参皂苷Re是参麦注射液活性成分的典型代表之一。同时, 人参皂苷Re在现行的参麦注射液质量标准(部颁标准WS3-B-3428-98-2010)中被作为标准物质。根据人参皂苷Re的药理活性和现行参麦注射液的质量标准, 本文采用人参皂苷Re作为Marker进行参麦注射液Beagle犬毒代动力学研究。

本研究采用人参皂苷Re作为Marker对参麦注射液进行毒代动力学研究, 与单一化合物人参皂苷Re的毒代动力学研究完全不同。后者是化学药物单一成分的毒代动力学研究, 而前者的研究对象是整个中药制剂, 采用人参皂苷Re作为Marker。中药制剂成分复杂, 可能有成分对Marker有诱导、抑制、药物相互作用等影响。

目前, 针对参麦注射液多种成分检测的方法或药物动力学研究已有较多报道^[12-14], 但均是不以药物注册为目的的科学研究。以科学研究为目的的毒代动力学可根据药理活性灵活选择多个Marker进行探索研究, 而以药物注册为目的的中药制剂的毒代动力学研究一般需参考权威标准进行。必须承认, 以人参皂苷Re作为Marker进行参麦注射液毒代动力学研究并不能代表参麦注射液的整体毒代动力学特征, 而即便采用多个Marker, 虽比单一Marker更有代表性, 但也不能完全代表参麦注射液的整体毒代动力学特征, 中药制剂的药物动力学研究仍需要进一步深入探讨。在目前缺乏更为权威、更为合适的中药质量标准的情况下, 以人参皂苷Re作为Marker进行参麦注射液毒代动力学研究不失为较好的选择, 本研究为中药等复杂制剂的毒代动力学、毒代动力学研究提供了参考。

综上所述, 在2000 - 20000 mg/kg剂量范围内, 参麦注射液中人参皂苷Re在Beagle犬体内呈线性代谢, 且给药3个月及6个月后仍保持线性代谢方式; 3个检测点系统暴露(AUC_(0-t))呈现先显著升高, 后略有减低的趋势, 参麦注射液中人参皂苷Re各个剂量组在给药3个月范围内有蓄积现象, 而系统暴露在给药3个月至6个月范围内达到稳态。

参考文献:

- [1]尹丽慧, 沃兴德. 参麦注射液的药理和临床研究进展[J]. 浙江中医药学院学报. 2001, 25(6): 65-68
- [2]韩利文, 张友刚, 李昊楠等. 参麦注射液治疗新型冠状病毒肺炎

(COVID-19)合并冠心病的网络药理分子机制探析[J]. 中草药, 2020, 51(09): 2334-2344.

[3]Min Wen, Lipan Yang, Hefei Huang, Gu Ye, Yuntao Jiang, Xiaobo Lv. Development of na HPLC-MS/MS method for the determination of ginsenosides Rg1 and Rb1 from 'Shenmai' Injection in beagle dogs after single and multiple doses and application in pharmacokinetics. 2023, 37(3): e5565. doi: 10.1002/bmc.5565.

[4]王若柳, 王海强, 范晓辉等. LC-Q-TOF-MS和LC-IT-MS分析参麦注射液中化学成分[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(03): 555-564.

[5]Jian Yu, Yan-Fei Xin, Li-Qiang Gu, Hai-Yan Gao, Li-Juan Xia, Zhen-Qiang You, Feng Xie, Zhu-Feng Ma, Zhi Wang, Yao-Xian Xuan. One-month toxicokinetic study of SHENMAI injection in rats. J Ethnopharmacol. 2014 11; 154(2): 391-9.

[6]李晓宇, 郝海平, 王广基, 孙建国, 梁艳, 谢林, 郑婷婷, 严蓓. 三七总皂苷多效应成分整合药代动力学研究[J]. 中国天然药物. 2008, 6(5): 377-381

[7]韩江敏, 林能明, 方罗. 不同厂家参麦注射液人参皂苷含量比较[J]. 中国现代应用药学杂志. 2006, 23(6): 510-512

[8]Son YM, Kwak CW, Lee YJ, Yang DC, Park BC, Lee WK, Han SH, Yun CH. Ginsenoside Re enhances survival of human CD4+ T cells through regulation of autophagy[J]. Int Immunopharmacol. 2010; 10(5): 626-631.

[9]姜红玉. 人参皂苷注射液对大鼠实验性心肌梗死的保护作用及其机制[D]. 吉林大学. 2004

[10]高莹, 杨积武, 王艳春, 王琪. 人参皂苷 Re 对大鼠心肌缺血再灌注细胞凋亡及 Caspase-3 的影响[J]. 辽宁中医药大学学报. 2011, (02): 123-124

[11]郑振中, 刘正湘, 刘晓春. 人参皂苷 Re 抑制心肌缺血再灌注损伤中性粒细胞浸润和髓过氧化物酶活性的研究[J]. 临床心血管病杂志. 2004, 20(12): 736-738

[12]李亭亭, 张宏艳. 人参皂苷 Re 对高儿茶酚胺大鼠心肌损伤的保护作用[J]. 实用儿科临床杂志. 2010, (19): 1511-1513

[13]陈彩霞, 张宏艳. 人参皂苷 Re 对家兔触发性室性心律失常血流动力学的影响[J]. 实用医学杂志. 2009, (14): 2237-2240

[14]刘奕明, 杨柳, 曾星, 邓远辉, 冯怡, 梁伟雄. 参麦注射液中人参皂苷 Rg1 和 Re 药代动力学研究[J]. 药学报. 2005, 40(4): 365-368

注:本工作受浙江省大学生创新创业训练计划项目(S202213023042)、浙江省教育厅项目(Y202249207)和浙江省医药卫生科技计划(2020KY529)资助。