

不同提取工艺的丹参提取物在大鼠体内的药动学研究

李津明, 王树瑶, 李 敏, 任君刚, 李 鑫

哈尔滨商业大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要: **目的** 研究不同提取方法所得丹参提取物中丹参酮II_A与丹酚酸B在大鼠体内的药动学。**方法** 大鼠禁食12 h后, 分别将加热回流法、集成法、醇酸回流法和梯度渗漉法所得丹参提取物 ig 给予大鼠, 对不同时点血浆中的目标成分进行定量测定, 绘制出各提取方法下的药时曲线并计算药动学参数。**结果** 对于丹参酮II_A而言, 加热回流法、集成法、梯度渗漉法和醇酸回流法所得提取物大鼠体内的 C_{\max} 分别为 (0.25±0.03)、(0.35±0.06)、(0.32±0.04)、(0.24±0.02) mg/L; AUC 为 (101.97±12.95)、(130.46±18.83)、(128.67±16.63)、(100.11±13.76) mg·min/L。对于丹酚酸B而言, 以上四种方法所得提取物在大鼠体内的 C_{\max} 分别为 (7.17±0.97)、(11.98±1.75)、(10.24±1.05)、(12.16±2.08) mg/L; AUC 为 (697.31±80.32)、(833.41±96.53)、(719.39±102.41)、(906.96±125.87) mg·min/L。**结论** 对定量测定和药动学参数进行统计分析, 可知集成法所提取的丹参脂溶性成分和水溶性成分含量均比较高, 并在体内有较好的吸收, 说明该法所得的提取物中丹参酮II_A和丹酚酸B的质量分数较高, 提取效果可能较好。

关键词: 丹参; 提取方法; 丹参酮II_A; 丹酚酸B; 药动学

中图分类号: R969.1 R943 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2012)05-0332-05

Pharmacokinetics of extract from *Salvia miltiorrhiza* by different methods in rats

LI Jin-ming, WANG Shu-yao, LI Min, REN Jun-gang, LI Xin

School of Pharmacy, Haerbin University of Commerce, Haerbin 150076, China

Abstract: Objective To study the pharmacokinetics of tanshinone II and salvianolic acid B extracted from *Salvia miltiorrhiza* by different methods in rats. **Methods** After fasted for 12 h, extracts from *S. miltiorrhiza* by different methods, such as heating reflux method, integrated method, gradient percolation, and acidity alcohol reflux method, were given to rats by ig administration, respectively. HPLC was used to determine the plasma concentration of active ingredients at different time points, then the concentration-time curve was mapped out and the pharmacokinetic parameters were calculated. **Results** For tanshinone II_A, the main pharmacokinetic parameters of heating reflux, integrated method, gradient percolation, and acidity alcohol reflux method were as follows: C_{\max} were (0.25 ± 0.02), (0.35 ± 0.05), (0.32 ± 0.04), and (0.24 ± 0.02) mg/L; AUC were (101.97 ± 12.95), (130.46 ± 18.83), (128.67 ± 16.63), and (100.11 ± 13.76) (mg·min)/L. For salvianolic acid B, the main pharmacokinetic parameters of different extracting methods were as follows: C_{\max} were (7.17 ± 0.97), (11.98 ± 1.75), (10.24 ± 1.05), (12.16 ± 2.08) mg/L; AUC were (697.31 ± 80.32), (833.41 ± 96.53), (719.39 ± 102.41), and (906.96 ± 125.87) mg·min/L. **Conclusion** The determination and statistical analysis of pharmacokinetic parameters demonstrated that compared with other methods, the extract of integrated method has higher content of liposoluble and water-soluble constituents, and good absorption *in vivo*, which means this method has better effect and the contents of tanshinone II and salvianolic acid B are higher.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bge.; extracting method; tanshinone II_A; salvianolic acid B; pharmacokinetics

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎, 味苦, 性微寒, 归心、肝经, 具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痛的功效^[1], 广泛应用于心脑血管疾病, 常以生药入药。其化学成分主要分为脂溶性(如丹参酮II_A、异丹参

酮等)和水溶性(如丹酚酸B、迷迭香酸、原儿茶醛等)两大类^[2]。本文以丹参中丹参酮II_A(tanshinone II_A)和丹酚酸B(salvianolic acid B)作为目标成分, 利用大鼠体内药动学, 研究集成提取法^[2]、酸性醇回流提取法^[3]、梯度渗漉提取法^[4-5]与加热回

收稿日期: 2012-08-25

基金项目: 黑龙江省留学归国科学基金项目(LC2011C06)

作者简介: 李津明(1962—), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药制剂现代剂型研究。Tel: (0451)84603522 E-mail: lijiming1962@163.com

流法制得提取物的质量, 为丹参提取工艺的选择提供参考。

1 材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪、Chromleon 6.8 工作站及数据处理软件(美国 Thermo Scientific 公司); AS3120A 超声清洗器(天津奥特赛恩斯有限公司); BS124S 电子天平(北京赛多斯仪器公司); XK96—A 涡旋混匀器(姜堰市新康医疗器械公司); 18790 干热样品浓缩装置(氮吹仪, 美国 Pierce 公司)。

1.2 药品与试剂

丹参饮片购于人民同泰大药房, 由哈尔滨商业大学药学院李鑫副教授鉴定为丹参 *Salvia miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; 丹参酮 II_A 对照品(批号 110766-200619) 与丹酚酸 B 对照品(批号 111562-200605) 均购于中国药品生物制品检验所, 甲醇、乙腈为色谱级, 水为双蒸水, 其他试剂均为分析纯。

1.3 实验动物

健康、体质量为 (250±20) g 的 Wistar 雄性大鼠, 由吉林大学白求恩医学院动物实验中心提供。实验动物许可证号 SYXK(吉)2007-0011。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制

精密称取 5.5 mg 丹参酮 II_A 对照品, 用甲醇溶解并定容于 50 mL 量瓶中, 摇匀, 得到质量浓度为 0.11 g/L 的丹参酮 II_A 对照品储备液。精密称取 12 mg 丹酚酸 B 对照品, 用水溶解置于 10 mL 量瓶中, 摇匀, 得到质量浓度为 1.2 g/L 的丹酚酸 B 对照品储备液。两者均保存于 4 °C 冰箱中。

2.2 色谱条件

Welch Ultimate C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL, 丹参酮 II_A: 流动相为甲醇-水 (73:27), 检测波长为 270 nm; 丹酚酸 B: 流动相为乙腈-甲醇-甲酸-水 (10:30:1:59), 检测波长为 286 nm。

2.3 样品的制备

2.3.1 提取物的制备 加热回流法: 过 8 号筛丹参药材粉末 100 g, 加乙醇回流两次, 每次 1.5 h, 滤过, 药渣加水回流 2 h, 合并 3 次滤液, 回收乙醇浓缩至浸膏。

集成法: 过 8 号筛丹参药材粉末 100 g, 加 70% 乙醇回流 1 h, 滤过, 药渣再用 8 倍量 70% 乙醇回流

1 h, 滤过, 合并 2 次滤液, 回收乙醇, 浓缩至浸膏。

梯度渗漉法: 过 8 号筛丹参药材粉末 100 g, 用适量 95% 乙醇溶胀, 装筒, 浸渍 24 h, 以 4 mL/min 渗漉, 收集渗漉液, 药渣用 50% 乙醇溶胀, 装筒, 以体积流量 4 mL/min 渗漉, 收集合并两次渗漉液并回收乙醇, 浓缩至浸膏。

酸性醇回流法: 过 8 号筛丹参药材粉末 100 g, 加入乙醇, 调溶液 pH 至酸性, 回流并滤过, 药渣用 70% 乙醇, 调溶液 pH 至酸性, 回流并滤过, 合并 2 次滤液, 回收乙醇, 浓缩至浸膏。

2.3.2 提取物的定量测定 根据《中国药典》2010 年版中丹参项下的丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 的含量测定方法^[1], 得出 4 种提取方法所得提取物中丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 分别为: 加热回流法为 1.05、30.78 mg/g; 集成法为 1.53、34.50 mg/g; 酸性醇回流法为 0.99、35.72 mg/g; 梯度渗漉法为 1.14、32.78 mg/g。

2.3.3 ig 样品的制备 取以上各方法所提取的丹参浸膏 10 g, 加入适量蒸馏水稀释溶解, 分别混匀制成相同质量浓度的丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 的 ig 样品溶液。

2.4 血浆样品的处理

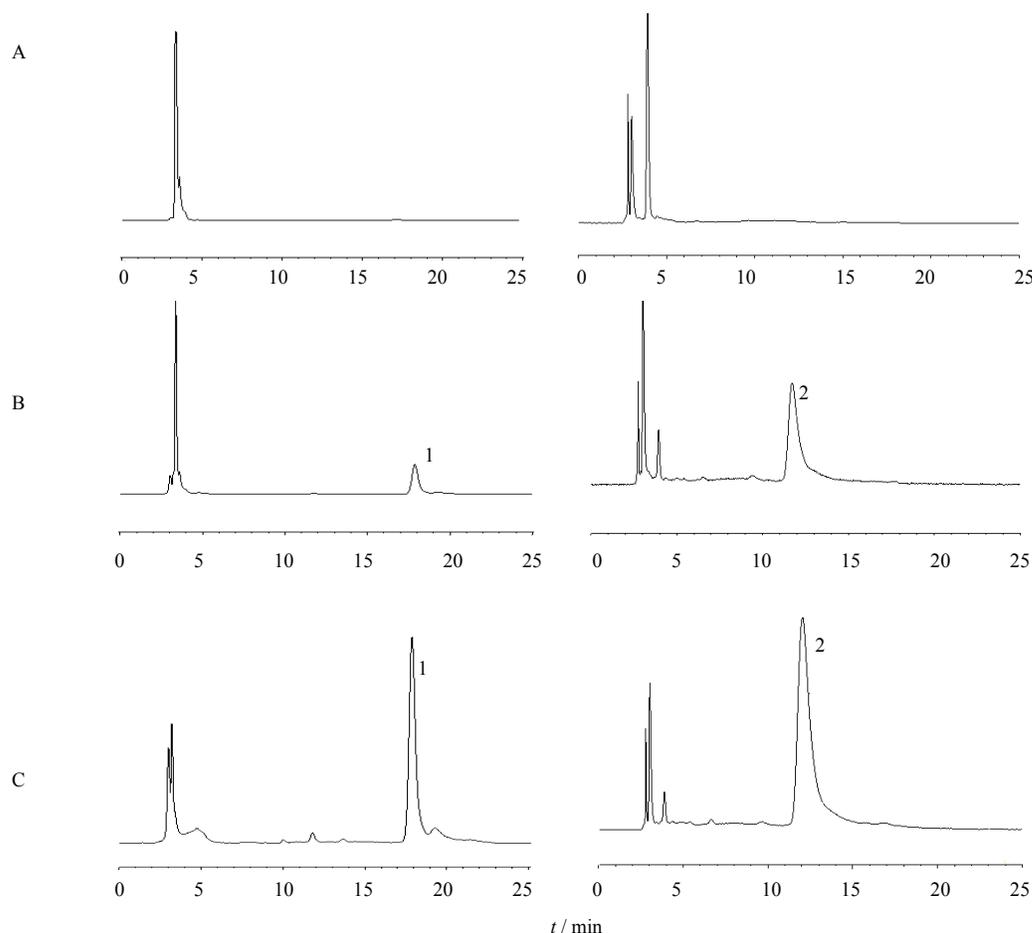
精密吸取 0.25 mL 血浆样品, 置于 5 mL 离心管中, 加入 1 mL 乙腈, 混合物经 2 min 涡旋震荡后, 以 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 37 °C 干燥氮气流吹干, 用 0.1 mL 流动相使残留物溶解, 再涡旋 2 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 进样测定。

2.5 专属性考察

在“2.2”项色谱条件下, 丹参酮 II_A 的保留时间为 18 min, 丹酚酸 B 的保留时间为 11.5 min。空白血浆, 空白血浆加丹参酮 II_A、丹酚酸 B 对照品和给药后血浆的色谱图如图 1 所示, 血浆中的内源性物质对两者的测定均无干扰。

2.6 方法学考察

2.6.1 线性关系与灵敏度考察 取大鼠空白血浆, 分别精密加入不同质量浓度的丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 对照品溶液, 使血浆中丹参酮 II_A 质量浓度为 0.01、0.04、0.07、0.1、0.4、0.7、1 mg/L; 血浆中丹酚酸 B 质量浓度为 0.15、0.3、0.9、1.5、3、9、15 mg/L, 按照“2.4”项进行处理, 按“2.2”项下测试, 以待测物的质量浓度 (X) 对峰面积 (Y) 进行加权回归 ($W=1/X^2$) 绘制标准曲线。得到丹参酮 II_A 的线性回归方程为 $Y=0.012X+0.04$ ($r=$



1-丹参酮II A 2-丹酚酸 B
1- tanshinone II A 2-salvianolic acid B

图1 空白大鼠血浆(A), 空白大鼠血浆加丹参酮II_A、丹酚酸B对照品溶液(B)和丹参提取物ig后大鼠血浆样品(C)高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank rat plasma (A), rat plasma spiked with TA II_A and SA B standard solution(B) and rat plasma after ig administration of extract of *S. miltiorrhiza* (C)

0.999 7), 线性范围为 0.01~1.00 mg/L; 最低检测限与定量限为 3、10 μg/L; 丹酚酸 B 的线性回归方程为 $Y=0.129 7X+0.594 4$ ($r=0.999 6$), 线性范围为 0.15~15 mg/L; 最低检测限与定量限为 0.05、0.15 mg/L。

2.6.2 精密度与准确度 取大鼠空白血浆, 配制低、中、高 (0.02、0.3、0.8 mg/L) 3 个质量浓度丹参酮 II_A 和低、中、高 (0.2、5、12 mg/L) 3 个质量浓度丹酚酸 B 的对照品血浆溶液, 每一浓度进行 5 次样本分析, 连续测定 5 d, 计算精密度和准确度, 结果见表 1。

2.6.3 稳定性 配制低、中、高 (0.02、0.3、0.8 mg/L) 3 个质量浓度丹参酮 II_A 和低、中、高 (0.2、5、

12 mg/L) 3 个质量浓度丹酚酸 B 的对照品血浆溶液, 分别考察样品室温放置 24 h 和反复冻融 3 次的稳定性, 结果丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 所有样品的

表 1 精密度与准确度

Table 1 Results of precision and accuracy

对照品	质量浓度/(mg·L ⁻¹)	RSD/%		准确度/%
		日间	日内	
丹参酮II _A	0.02	5.5	6.3	87.21±2.94
	0.3	6.9	7.6	90.72±2.75
	0.8	3.6	4.7	94.17±2.59
丹酚酸B	0.2	6.6	7.1	97.92±2.01
	5	7.0	7.8	99.17±1.98
	12	5.4	6.4	102.85±1.37

RSD 均小于 7%，表明在上述环境中处理后血浆样品稳定。

2.6.4 提取回收率试验 配制低、中、高 (0.02、0.3、0.8 mg/L) 3 个质量浓度丹参酮 II_A 和低、中、高 (0.2、5、12 mg/L) 3 个质量浓度丹酚酸 B 的对照品血浆溶液，按照“2.4”项进行处理后，每一浓度进行 5 次样本分析。以血浆处理后进样的色谱峰面积分别与用甲醇配制而成的相同浓度对照品溶液直接进样获得的峰面积之比计算提取回收率，结果丹参酮 II_A 与丹酚酸 B 不同质量浓度血浆对照样品的提取回收率分别为 (70.2±5.73)%、(74.7±4.58)%、(79.3±3.98)%；(72.6±5.12)%、(73.4±4.98)%、(76.8±4.05)%。

2.7 丹参不同提取方法的药动学研究

取实验前 12 h 禁食的 Wistar 大鼠 48 只，平均分成 4 组，分别用 4 种不同提取方法，ig 给药 (剂量为 0.02 mL/g)，给药后不同时间点进行眼眶取血，按照“2.4”项进行血浆样品的处理，测定各时间点丹参酮 II_A、丹酚酸 B 的血药浓度，分别绘制丹参酮 II_A、丹酚酸 B 的血药浓度 - 时间曲线 (图 2、3)，用 3P97 药动学软件与 SPSS19.0 软件对数据进行处理，得到不同提取法下的丹参酮 II_A、丹酚酸 B 药动学参数 (表 2、3)。

3 结论与讨论

本研究通过考察集成法、醇酸回流法、梯度渗漉法和加热回流法对丹参中的脂溶性有效成分丹参酮 II_A、水溶性有效成分丹酚酸 B 进行提取并进行大鼠 ig，通过对不同时间点的血中药物含量的测定，可得到各提取方法下两种有效成分的药时曲线和药动学参数并进行统计学分析与比较。可知，对于丹参酮 II_A 的体内吸收而言，集成提取法和梯度渗漉法明显大于加热回流法和醇酸回流法；对于丹酚酸 B 的体内吸收而言，醇酸回流法和集成法

明显大于梯度渗漉法与加热回流提取法，而集成提取法无论是丹酚酸 B，还是丹参酮 II_A 的体内吸收均较高，说明该方法可能对丹参中的丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 的提取率较高。集成提取法综合性强，方法简单，具有快速、价廉、省时等优点，有较好的工业化发展趋势，可对此种丹参提取方法进行进一步的研究。

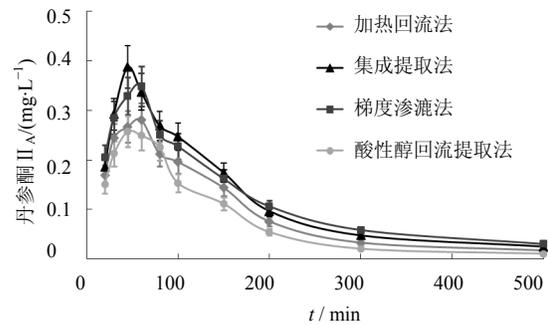


图 2 四种工艺提取物大鼠 ig 后血浆中丹参酮 II_A 平均血药浓度 - 时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves of tanshinone II_A by ig administration with different extracting methods ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

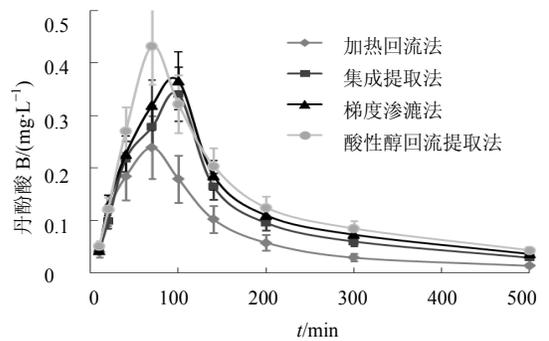


图 3 四种工艺提取物大鼠 ig 后血浆中丹酚酸 B 平均血药浓度 - 时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Mean plasma concentration-time curves of salvianolic acid B by ig administration with different extracting methods ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 2 4 种提取方法下丹参酮 II_A 在大鼠体内药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Main pharmacokinetic parameters of TA II_A with different extracting methods in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

方法	$t_{1/2}(k_a)/\text{min}$	$t_{1/2}(k_e)/\text{min}$	$t_{\text{max}}/\text{min}$	$C_{\text{max}}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\text{AUC}/(\text{mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1})$	$\text{CL}/(\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1})$	$\text{V}/(\text{L}\cdot\text{g}^{-1})$
加热回流法	7.03±0.75	254.99±30.85	48.40±3.79	0.25±0.02	101.97±12.95	8.03±1.20	3.12±0.42
集成法	7.81±0.98	254.97±38.54	52.53±5.42	0.35±0.05*	130.46±18.83*	8.09±0.97	3.11±0.35
梯度渗漉法	7.23±0.89	255.95±27.01	45.28±4.38	0.32±0.04*	128.67±16.63*	7.98±0.85	3.13±0.31
醇酸回流法	7.06±1.20	252.46±35.62	54.13±5.09	0.24±0.03	100.11±14.76	8.11±1.07	3.15±0.47

与加热回流法相比* $P < 0.05$ ，下表同

* $P < 0.05$ vs heating reflux method, same as below

表3 四种提取方法下丹酚酸B在大鼠体内药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 3 Main pharmacokinetic parameters of SA B with different extracting methods in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

方法	$t_{1/2}(k_a)/\text{min}$	$t_{1/2}(k_e)/\text{min}$	$t_{\text{max}}/\text{min}$	$C_{\text{max}}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\text{AUC}/(\text{mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1})$	$\text{CL}/(\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1})$	$V/(\text{L}\cdot\text{g}^{-1})$
加热回流法	13.44±1.95	38.71±4.19	37.73±5.02	7.17±0.97	697.31±80.32	1.43±0.21	76.00±9.21
集成法	12.28±2.03	39.07±6.34	49.43±6.38	11.98±1.75*	833.41±96.53*	1.36±0.15	57.00±6.13
梯度渗漉法	10.00±1.52	36.88±5.22	45.83±5.47	10.24±1.05	719.39±102.41	1.39±0.19	74.00±9.27
酸醇回流法	15.54±3.20	37.54±4.97	36.28±4.39	12.16±2.08*	906.96±125.87*	1.10±0.11	50.00±5.84

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 任志会, 苏会霞, 柏艳柳. 丹参脂溶性及水溶性成分集成提取工艺研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(3): 54-56.
- [3] 于沈晶, 殷文广, 修志龙. 丹参不同提取工艺的研究 [J]. 中草药, 2007, 38(4): 542-545.
- [4] 袁瑜, 张良, 李玉锋, 等. 渗漉法提取白芷总香豆素的工艺研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(2): 302-303.
- [5] 张莲莲, 谈锋, 李连强, 等. 渗漉法制备紫衫醇浸膏工艺研究 [J]. 西南大学学报, 2007, 29(2): 75-79.

欧洲药监局最终同意批准首个基因治疗药物 Glybera

继三次拒绝之后, 欧洲药品监管局已建议批准西方国家第一个基因治疗药物 Glybera, 这在创新药领域中是一个重要的突破。自从应用创新方法用于修复基因缺陷的首次试验开始 20 多年来, 科学家和制药公司一直致力于基因治疗的实践中。Glybera 是极罕见遗传病脂蛋白脂酶缺乏 (LPLD) 患者的一个可能的救命索。LPLD 患者不能处理血浆中的脂肪颗粒, 无法进行正常饮食。据估计, 每一百万人中不超过一、两个人患有此种疾病, 这种疾病可以引起急性胰腺炎, 从而导致死亡。

Glybera 获得批准极具挑战性, 因为发病率极低, 该公司只对 27 例患者进行了临床试验。因为数据不充分, 使得欧洲药品管理局在最初批准时很犹豫。但伦敦的监督部门认为, 现在批准对于病情恶劣的患者很有益处, 条件是继续接受一次性治疗。

(本刊讯)