

丹参醇提物在大鼠体内的药动学研究

李莉, 蒋学华*, 袁媛, 王凌, 杨俊毅, 周静

(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘要:目的 建立大鼠血浆中丹参酮Ⅱ_A和隐丹参酮的HPLC-UV检测法,并研究丹参脂溶性成分在大鼠体内的药动学。方法 以吉非罗齐为内标,血浆样品经简单的甲醇沉淀蛋白后,上清液直接进样测定。大鼠尾iv丹参醇提取物(以丹参酮Ⅱ_A计为5 mg/只),测定各时点丹参酮Ⅱ_A和隐丹参酮的血药浓度,绘制药-时曲线,采用3p87计算药动学参数。结果 大鼠尾iv丹参醇提取物后,丹参酮Ⅱ_A的主要药动学参数分别为: $t_{1/2\alpha}$ 为 (0.088 ± 0.024) h, $t_{1/2\beta}$ 为 (2.1 ± 0.7) h; V_c 为 (0.8 ± 0.6) L; CL为 (2.0 ± 1.1) L/h⁻¹; AUC_{0-4} 和 $AUC_{0-\infty}$ 分别为 (2.2 ± 0.9) mg·h/L和 (3.4 ± 1.7) mg·h/L。结论 丹参醇提取物iv给药后,丹参酮Ⅱ_A的药-时曲线符合二室模型,血浆中丹参酮Ⅱ_A迅速下降,表观分布容积大;隐丹参酮在血浆中消除快,药动学参数不易获得。

关键词:丹参;丹参醇提取物;丹参酮Ⅱ_A;隐丹参酮;药动学;高效液相色谱

中图分类号:R286.02; R285.01

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2005)10-1480-03

Pharmacokinetics of alcohol extract of *Radix Salviae Miltiorrhizae* in rat *in vivo*

LI Li, JIANG Xue-hua, YUAN Yuan, WANG Ling, YANG Jun-yi, ZHOU Jing

(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Objective** To establish a sensitive HPLC method with UV detection for the determination of tanshinone II_A (TS II_A) and cryptotanshinone (CT) in rat plasma and to study pharmacokinetics of *Radix Salviae Miltiorrhizae* (RSM) liposoluble components in rat *in vivo*. **Methods** TS II_A and CT in plasma of rat at different sampling time were determined by pretreatment with Gemfibrozil as internal standard, the protein was precipitated in methanol solution after iv administration of alcohol extract of RSM 5 mg/per animal. The mean plasma concentration-time curve was protracted and pharmacokinetic parameters were calculated by 3p87. **Results** The main pharmacokinetic parameters of TS II_A were as follows: $t_{1/2\alpha}$ was (0.088 ± 0.024) h; $t_{1/2\beta}$ was (2.1 ± 0.7) h; V_c was (0.8 ± 0.6) L; CL was (2.0 ± 1.1) L/h⁻¹; AUC_{0-4} and $AUC_{0-\infty}$ were (2.2 ± 0.9) mg·h/L and (3.4 ± 1.7) mg·h/L, respectively. **Conclusion** The concentration-time curve of TS II_A can be fitted to two-compartment model after ethanol extract of RSM iv administrated. Concentration of TS II_A in rat plasma declines rapidly with large apparent volume of distribution. CT decreases also rapidly and it is difficult to acquire its pharmacokinetic parameters in rat.

Key words: *Radix Salvia Miltiorrhiza* (RSM); alcohol extract of *Salvia Miltiorrhiza* Radix (AERSM) tanshinone II_A (TS II_A); cryptotanshinone (CT); pharmacokinetics; HPLC

丹参脂溶性成分系从唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的根中提取纯化得到的二萜醌类化合物,其中丹参酮Ⅱ_A(tanshinone II_A, TS II_A)、隐丹参酮(cryptotanshinone, CT)、丹参酮Ⅰ(tanshinone I, TS I)较多,生理活性较强。体外试验证明,丹参脂溶性成分具有抗血小板聚集作用^[1]、抗血栓作用和对实验性心肌缺血和再灌注损伤具有保护作用,以及较强的抗菌活性^[2]。临床上应用以丹参脂溶性部位入药的丹参制剂治疗化脓性疾

病、心脑血管疾病,效果满意^[3]。本实验建立了血浆中丹参酮Ⅱ_A和隐丹参酮的反相高效液相色谱法,并对其在大鼠体内的药动学进行了研究。

1 实验材料

S-8010 高效液相色谱仪,包括 Soma 400 智能泵和 S-3702 紫外可见检测器(日本 SOMA),ANASTAR 色谱工作站;YKH-II 型液体快速混合器(江西医疗器械厂);TGL-16 高速离心机(上海医用分析仪器厂);PHS-4C 型酸度计(成都方舟

收稿日期:2004-11-08

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070935;30271614)

作者简介:李莉(1979-),四川内江人,药学硕士,主要从事新药开发研究工作。Tel: (028) 80989144 E-mail: lily_309@163.com

*通讯作者 蒋学华 (028) 85501370 E-mail: jxh1013@163.com

科技开发公司)。

TS I_A 和 CT 对照品由中国药品生物制品检定所提供;丹参酮提取物(主要含 CT 6.31%、TS I_A 14.73%、TS I_A 55.63%)由华康美萃制药公司提供;内标吉非罗齐由乐山三九长征股份有限公司提供;高效液相用有机溶剂为色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯。

健康 Wistar 大鼠(190~200 g),雌雄兼用,由四川大学动物中心提供。

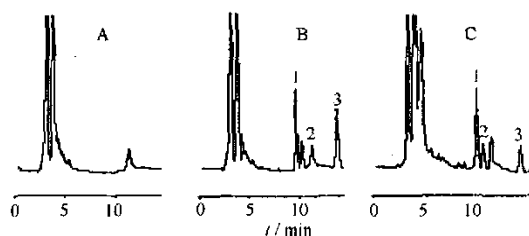
2 方法和结果

2.1 大鼠血浆制备:随机取大鼠,尾静脉采血 0.5 mL,于肝素化试管中,离心,取上清液得 0.1 mL 血浆。

2.2 血浆样品处理:精密量取血浆样品 0.1 mL,精确加入内标吉非罗齐溶液(100 μg/mL) 0.1 mL,甲醇 0.2 mL,漩涡 1 min,10 000 r/min,离心 5 min,取上清液 20 μL 供 HPLC 检测。

2.3 色谱条件:色谱柱:Diamondsil™ C₁₈ 钻石(250 mm×4.6 mm, 5 μm),Diamondsil 保护柱;流动相:甲醇-水(84:16);体积流量:1 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:35℃。理论塔板数按 TS I_A 计不低于 9 000,TS I_A 拖尾因子为 1.047,CT 与内标分离度≥1.5。

2.4 方法专属性考察:在上述色谱条件下,测得空白血浆、吉非罗齐(内标)+TS I_A+CT+空白血浆、血浆样品的色谱图 1。可见,内标、CT 和 TS I_A 保留时间分别为 9.7、10.4、14.0 min,血浆中物质不干扰内标、CT 与 TS I_A 的测定。



1-内标 2-CT 3-TS I_A
1-internal standard 2-CT 3-TS I_A

图1 空白血浆(A)、混合物(B)和样品(C)的HPLC图

Fig. 1 HPLC chromatograms of plasma (A), mixture (B), and sample (C)

2.5 标准曲线制备:取 TS I_A 对照品约 10 mg,置 25 mL 量瓶中,甲醇溶解稀释至刻度,得 400 μg/mL TS I_A 对照品贮备液。CT 对照品约 10 mg,置 100 mL 量瓶中,甲醇溶解稀释至刻度,得 100 μg/mL 隐丹参酮对照品贮备液。

精密量 TS I_A、CT 对照品贮备液适量,分别用

甲醇稀释成系列质量浓度的对照品工作液,各取 50 μL 加入 0.1 mL 血浆,得到一系列含药血浆,质量浓度分别为:CT 0.10、TS I_A 0.10 μg/mL,CT 0.20、TS I_A 0.50 μg/mL,CT 0.40、TS I_A 1.6 μg/mL,CT 1.0、TS I_A 4.0 μg/mL,CT 2.0、TS I_A 6.4 μg/mL,CT 3.0、TS I_A 8.0 μg/mL,CT 4.0、TS I_A 12.0 μg/mL。加入内标溶液 0.1 mL,甲醇 0.1 mL,漩涡 1 min,10 000 r/min 离心 5 min。取上清液 20 μL 在上述色谱条件下进样,测定血浆样品中药物峰面积(A_s)与内标峰面积(A_i),计算药物峰面积与内标峰面积的比值 Y(A_s/A_i)。以 Y 作为纵坐标,血浆中 CT、TS I_A 质量浓度 C 为横坐标,进行加权回归的方法得到 CT、TS I_A 的标准曲线方程、相关系数和线性范围。CT:Y=0.316 4 C+0.014 9, r=0.999 1,线性范围:0.10~4.0 μg/mL; TS I_A:Y=0.208 0 C+0.013 8, r=0.994 0,线性范围:0.10~12.0 μg/mL。

2.6 精密度试验:精密量取 CT、TS I_A 对照品贮备液适量,用甲醇稀释成系列质量浓度的对照品工作液,各取 50 μL 加入 0.1 mL 血浆,按标准曲线的制备方法,配制高、中、低 3 种不同质量浓度的含药血样,于 1 d 内 5 次测定,计算日内精密度,一周内 5 日测定,计算日间精密度,结果见表 1。

表1 精密度试验结果(n=5)

Table 1 Results of precision test (n=5)

丹参脂溶性成分	加入量/ng	RSD/%	
		日内	日间
CT	5	3.14	4.45
	50	1.51	3.72
	200	2.05	3.84
TS I _A	5	2.33	5.81
	200	0.97	2.63
	600	1.72	3.11

2.7 回收率试验:精密量取 TS I_A、CT 对照品工作液,各取 50 μL 加入 0.1 mL 血浆,配制高、中、低 3 个质量浓度的含药血样,按标准曲线方法,从“加入内标溶液 0.1 mL”开始操作,以测得值与加入量的比值计算回收率,结果见表 2。

表2 回收率试验结果(n=5)

Table 2 Results of recovery test (n=5)

丹参脂溶性成分	加入量/ng	测得量/ng	回收率/%	RSD/%
CT	5	4.9	97.4	3.14
	50	49.6	102.1	1.51
	200	197.3	98.9	1.05
TS I _A	5	5.1	101.9	2.33
	200	199.4	99.7	0.97
	600	603.0	100.5	0.72

2.8 丹参脂溶性成分大鼠体内药动学:取丹参醇提取物约125.0 mg,置50 mL棕色量瓶中,加1.0 mL DMSO,超声分散,加入10%聚山梨酯80水溶液2.5 mL,摇匀后pH 7.4磷酸缓冲盐溶液稀释定容,摇匀,得到丹参提取物溶液。Wistar大鼠5只,空腹过夜(自由饮水),尾iv丹参醇提取物溶液2 mL。给

药前采集空白血浆约0.4 mL,给药后于5、10、15、20、30、60、90、120、180、240 min断尾取血约0.4 mL,离心分离血浆,血样照前法立即处理测定药物的质量,计算平均血药浓度,结果见表3。采用中国药学会编制的3p87程序对经时血药浓度数据进行处理,得到TSⅡ_A主要药动学参数,见表4。

表3 大鼠尾iv丹参醇提取物后血浆中丹参脂溶性成分的质量变化浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 3 Concentration changes of liposoluble components in rat plasma by iv tail of AERSM ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$, $n=5$)

成分	t/min									
	5	10	15	20	30	60	90	120	180	240
TSⅡ _A	5.74±4.32	3.02±2.07	1.55±0.71	1.08±0.46	0.66±0.19	0.49±0.14	0.361±0.146	0.275±0.086	0.227±0.084	0.165±0.057
CT	1.07±0.62	0.79±0.52	0.50±0.33	0.39±0.26	0.18±0.08	0.08±0.06	0.03±ND	未测到	未测到	未测到

表4 丹参酮Ⅱ_A的主要药动学参数

Table 4 Main pharmacokinetic parameters of TSⅡ_A

参数	单位	数值($\bar{x} \pm s$)
α	h^{-1}	8.44±2.43
β	h^{-1}	0.35±0.12
$t_{1/2\alpha}$	h	0.09±0.02
$t_{1/2\beta}$	h	2.14±0.74
V_e	L	0.8 ± 0.57
CL	L/h	1.96±1.1
k ₂₁	h^{-1}	1.00±0.44
k ₁₀	h^{-1}	3.44±2.07
k ₁₂	h^{-1}	4.36±1.32
AUC ₀₋₁	$\text{mg} \cdot \text{h/L}$	2.16±0.90
AUC _{0-∞}	$\text{mg} \cdot \text{h/L}$	3.40±1.72
MRT ₀₋₁	h	0.92±0.24
MRT _{0-∞}	h	2.22±1.14

药前采集空白血浆约0.4 mL,给药后于5、10、15、20、30、60、90、120、180、240 min断尾取血约0.4 mL,离心分离血浆,血样照前法立即处理测定药物的质量,计算平均血药浓度,结果见表3。采用中国药学会编制的3p87程序对经时血药浓度数据进行处理,得到TSⅡ_A主要药动学参数,见表4。

3.2 大鼠iv丹参醇提取物,丹参酮Ⅱ_A体内药动学过程及动力学参数尚属首次报道。薛明^[4]等报道了隐丹参酮在猪体内的药动学过程和主要动力学参数 $t_{1/2\alpha} = (2.36 \pm 1.62) \text{ min}$, $V = (45.25 \pm 22.17) \text{ L/kg}$,与本研究丹参酮Ⅱ_A的参数相近。如果能够排除试验动物的种属差异,那么上述比较结果可以说明丹参酮Ⅱ_A与隐丹参酮的体内药动学过程相近,丹参中的量最高的脂溶性成分丹参酮Ⅱ_A在脂溶性成分的体内研究中可作为检测的指标成分。

References:

- [1] Guo M M, Guo H P. Study progress of *Radix Salviae Miltiorrhizae* in pharmacology, preparations and clinical application [J]. *Chongqing Med J* (重庆医学), 1998, 27 (5): 308-310.
- [2] Chen W. Pharmacology of *Salvia miltiorrhiza* Bge [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1984, 19 (11): 876-880.
- [3] Zhang T. A review on extracting technology of *Salvia miltiorrhiza* Bge. and the clinical application of its compounds [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 1999, 10 (5): 378-379.
- [4] Xue M, Cui Y, Wang H Q. Pharmacokinetics of cryptotanshinone and its metabolism in pigs [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, 34 (2): 81-84.

3 讨论

3.1 大鼠iv丹参醇提取物(以TSⅡ_A计为5 mg/只)后,TSⅡ_A的体内血药浓度曲线符合二室模型。主要药动学参数为: $\alpha = 8.436 \text{ h}^{-1}$, $\beta = 0.354 \text{ h}^{-1}$, $\text{AUC} = 3.398 \text{ mg} \cdot \text{h/L}$ 。可见体内分布快,表观容积大,血药浓度下降迅速,消除较慢,血中药物浓度长时间保持低水平。丹参醇提取物中隐丹参酮的量低,注射给药后,大鼠体内血药浓度低,下降快。给药后30~90 min,仅有部分大鼠的血浆中能检测到隐丹参酮,由于实验数据有限,难以得到隐丹参酮的药

《中草药》投稿特别注意事项

1. 实验性论文需要单位介绍信(注明:论文内容真实,作者排名无争议,无一稿两投,无泄密)。
2. 创新性论文优先发表,新化合物免收版面费。
3. 图题、表题、图注、表注需中英文双语表示。
4. 文后参考文献译成英文。
5. 本刊不收审稿费,但刊用稿件要收取版面费。
6. 投稿时请留下联系方式(电话和E-mail)。