

• 药理与临床 •

丹参二萜醌组分及其固体分散体微丸中主要成分在大鼠体内的药动学研究

郁丹红^{1,2}, 贾晓斌^{1,2*}, 施亚琴², 萧伟^{3*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046

2. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药释药系统重点研究室, 江苏 南京 210028

3. 江苏康缘药业股份有限公司 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: **目的** 建立大鼠血浆中丹参二萜醌组分中 4 个主要成分二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮及丹参酮 II_A 的 UPLC-MS/MS 测定方法, 用于丹参二萜醌组分及其固体分散体微丸的药动学研究。**方法** SD 大鼠分别 ig 给予丹参二萜醌组分固体分散体微丸及其原料药后, 于不同时间点采集血浆样本, UPLC-MS/MS (以多反应离子监测方式) 进行正离子检测, 测定二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮及丹参酮 II_A 血药浓度, DAS 2.1.1 软件计算丹参二萜醌组分固体分散体微丸及其原料药在大鼠体内的主要药动学参数。**结果** 血浆中丹参二萜醌组分中 4 个主要成分日内、日间精密度 (RSD) 均小于 14.6%, 提取回收率均大于 74.49%。药动学研究结果表明, 与 ig 丹参二萜醌组分原料药相比, ig 给予其固体分散体微丸后, 丹参二萜醌组分中 4 个主要成分的 C_{max} 和 $AUC_{0-\infty}$ 均不同程度地提高 ($P < 0.05$)。**结论** 本方法专属性强、灵敏度高, 适用于丹参二萜醌组分及其固体分散体微丸中多成分的药动学研究; 固体分散体微丸技术通过增加丹参二萜醌组分的溶解性, 促进其在体内的吸收, 各主要成分的相对生物利用度为原料药的 138%~204%。

关键词: 丹参二萜醌组分; 固体分散体微丸; 二氢丹参酮 I; 丹参酮 I; 隐丹参酮; 丹参酮 II_A; 药动学; UPLC-MS/MS

中图分类号: R969.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)07-0851-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.07.015

Pharmacokinetics of main components in *Salvia Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* diterpene quinones composition and its solid dispersion micro-pellets in rats *in vivo*

YU Dan-hong^{1,2}, JIA Xiao-bin^{1,2}, SHI Ya-qin², XIAO Wei³

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

3. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

Abstract: **Objective** To establish a UPLC-MS/MS method for determining the plasma concentration of dihydrotanshinone I, tanshinone I, cryptotanshinone, and tanshinone II_A in rats, and to study the pharmacokinetics of *Salvia miltiorrhiza* diterpene quinones composition (SMDQC) and its solid dispersion micro-pellets (SDMP). **Methods** Sprague-Dawley rats were ig administered with SMDQC and its SDMP, respectively. Then the blood samples were obtained at different time points. Electrospray ionization (ESI) source was applied and operated in the positive ion mode. The plasma concentration of dihydrotanshinone I, tanshinone I, cryptotanshinone, and tanshinone II_A was then detected by UPLC-MS/MS, and the pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 2.1.1 program. **Results** The RSDs of intra- and inter-day precisions of all analytes were less than 14.6%, and the average recoveries of the four active constituents were more than 74.49%. The pharmacokinetic results showed that after ig administration of SDMP, C_{max} and $AUC_{0-\infty}$ of the four active constituents increased significantly compared with those of SMDQC. **Conclusion** The method has the

收稿日期: 2012-10-27

基金项目: 江苏省中医药领军人才项目 (2006); 中药制药过程新技术国家重点实验室开放基金 (SKL2010Z0303)

作者简介: 郁丹红 (1987—), 女, 江苏南通人, 在读硕士, 主要研究方向为中药新剂型的设计与评价。E-mail: xiaoyu9456@sina.com

*通信作者 贾晓斌 Tel: (025)85608672 E-mail: xiaobin_jia_nj@126.com

萧伟 Tel: (0518)85521956 Fax: (0518)85522017

high sensitivity and selectivity, and proves to be suitable for the pharmacokinetic study of SMDQC and its SDMP. The results show that the SDMP could enhance the solubility of SMDQC to improve its absorption. The relative bioavailability of the four representative constituents is 138%—204% of the crude drug.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* diterpene quinones composition; solid dispersion micro-pellets; dihydrotanshinone I; tanshinone I; cryptotanshinone; tanshinone II_A; pharmacokinetics; UPLC-MS/MS

中药组分是一个复杂的系统, 中药组分制剂药动学的研究需考虑多组分的特点及组分性质, 基于组分的整体性, 以能够表征组分整体性质的主要成分为指标, 并通过分析组分内多成分共存时各主要成分的药动学参数, 最终阐明其制剂整体的药动学特征^[1-2]。丹参二萜醌组分 (*Salvia miltiorrhiza* diterpene quinones composition, SMDQC) 系由唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎经加工制成, 具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦的功效, 以及抗血小板聚集、保护心肌缺血等诸多药理作用, 广泛用于心血管疾病的治疗^[3-5]。丹参酮 II_A、丹参酮 I、隐丹参酮及二氢丹参酮 I 均是丹参二萜醌组分的主要活性成分。前期研究表明, 上述 4 个成分配伍后的药理作用与丹参二萜醌组分无显著性差异, 能够代表丹参二萜醌组分的整体性质。目前对丹参二萜醌组分制剂药动学的研究多数只针对于其中的 1 个或 2 个指标性成分, 存在一定的片面性, 不能充分说明组分制剂整体的药动学特征^[6-9]。因此, 本实验采用超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法分析比较大鼠 ig 丹参二萜醌组分固体分散体微丸及其原料药后, 血浆中丹参酮 II_A、丹参酮 I、隐丹参酮及二氢丹参酮 I 的药动学特征, 从而为后期丹参二萜醌组分固体分散体微丸整体的药动学评价研究提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

丹参二萜醌组分, 江苏省中医药研究院中药制剂室提供, 其中丹参酮 II_A、丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮 I 的质量分数分别为 22.40%、13.97%、6.27%、3.87%; 丹参酮 II_A 对照品 (批号 ZL201106010B, 质量分数 > 98%)、丹参酮 I 对照品 (批号 ZL201206010A, 质量分数 > 98%)、隐丹参酮对照品 (批号 ZL201204012Y, 质量分数 > 98%), 南京泽朗科技有限公司; 二氢丹参酮 I 对照品 (批号 E0059, 质量分数 > 98%), 上海顺勃生物工程公司; 内标克拉霉素对照品 (批号 130356-200403, 质量分数 > 98%), 中国药品生物制品检定所。乙腈、甲醇为色谱纯, Tedia 公司; 超纯水由

Milli-Q 纯水机制备。

1.2 动物

SD 大鼠, 雌雄兼用, 体质量 (220 ± 10) g, 由江苏省中医药研究院动物中心提供, 许可证号: SCK (沪) 2007-0005。

1.3 仪器

AcuityTM UPLC 超高效液相色谱系统, XevoTM TQ 质谱系统, 美国 Waters 公司; AB135—S 分析电子天平 (十万分之一), 瑞士 Mettler Toledo 公司; KQ5200DE 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; TGL—16G 离心机, 上海安亭科学仪器厂; 氮吹仪, 美国 Organomation 公司。

2 方法与结果

2.1 丹参二萜醌组分固体分散体微丸的制备

采用固体分散技术以及挤出滚圆技术制备丹参二萜醌组分固体分散体微丸, 最终优选处方。采用溶剂法将丹参二萜醌组分与聚乙烯吡咯烷酮 K30 以 1 : 6 的载药比制备成固体分散体。取固体分散体 25 g、微分硅胶 2 g、羧甲基淀粉钠 2 g、微晶纤维素 21 g, 充分混匀, 润湿剂为 70% 乙醇 28 mL, 制备成软材。挤出滚圆工艺条件: 挤出频率 25 Hz, 滚圆频率 30 Hz, 滚圆时间 6 min, 制备微丸。将所得微丸烘干, 过 18~24 目筛即得丹参二萜醌组分固体分散体微丸 (solid dispersion micro-pellets, SDMP)。

2.2 分组、给药与血样采集

实验前大鼠禁食不禁水 12 h。将大鼠平均分为 2 组 (每组 6 只, 雌雄各半), 分别单剂量 ig 给予丹参二萜醌组分 30 mg/kg、固体分散体微丸 420 mg/kg (相当于含丹参酮 II_A 6.72 mg/kg, 丹参酮 I 4.19 mg/kg, 隐丹参酮 1.88 mg/kg, 二氢丹参酮 I 1.16 mg/kg)。为了不破坏固体分散体微丸的剂型, 采用自制的不锈钢灌胃针将微丸整体 ig 给药。分别于给药前及给药后 5、15、30、45、60、90、120、240、360、480、720、1 440 min, 眼眶后静脉丛取血 0.5 mL, 置于肝素钠抗凝管中, 3 500 r/min 离心 15 min, 分离血浆, 于 -70 °C 冷冻保存待测。

2.3 丹参二萜醌组分中主要成分测定

2.3.1 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量,

分别置 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇超声溶解并稀释至刻度。各取上述对照品溶液 1 mL,置 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇超声混匀,并稀释至刻度,得到混合对照品储备液,其中二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 以及丹参酮 II_A 的质量浓度分别为 45.1、44.8、44.9、45.2 μg/mL。取上述混合对照品溶液,用甲醇稀释成 8 种不同质量浓度的工作液,4 °C 冰箱避光保存备用。

2.3.2 内标溶液制备 精密称取适量克拉霉素,置 10 mL 量瓶中,加甲醇超声溶解,配制成质量浓度为 400 μg/mL 内标储备液,再取适量储备液用甲醇稀释至 4.00 μg/mL 的内标工作液。

2.3.3 血浆样品处理 取 100 μL 血浆样品,加入 10 μL 内标工作液,涡旋混匀后加入 300 μL 甲醇,涡旋震荡 60 s,13 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,氮气吹干。残渣加入 100 μL 流动相复溶,涡旋震荡 5 min,13 000 r/min 离心 10 min 后取上清进样分析。

2.3.4 色谱与质谱条件

色谱条件:色谱柱为 Acquity™ UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm),流动相为 0.1%冰醋酸水溶液-乙腈(25:75),体积流量 0.4 mL/min,进样量 4 μL,柱温 35 °C。

质谱条件:ESI 离子源,正离子检测方式,多反应监测(MRM)扫描方式,离子源温度 150 °C,去溶剂气温度 550 °C。

采用 MassLynx 软件分析,4 个待测成分及内标的其他主要质谱检测参数见表 1。

2.3.5 方法学考察

(1) 专属性考察:按“2.3.3”项下方法分别制备空白血浆、空白血浆加混合对照品加内标溶液及给药后 1 h 的血浆样品,考察方法的专属性。结果表明,空白血浆中的内源性物质不干扰样品峰,各对照品及内标克拉霉素的峰分离良好,相互间无干

扰,方法专属性好。结果见图 1。

(2) 标准曲线绘制与定量限:取空白血浆 120 μL,分别加入不同质量浓度的混合对照品工作液 30 μL,配制成相当含二氢丹参酮 I 3 000、300、150、75、30、15、7.5、1.5 ng/mL,隐丹参酮 2 993、299.33、149.67、74.83、29.93、14.97、7.49、1.50 ng/mL,丹参酮 II 2 987、298.67、149.33、74.67、29.87、14.93、7.47、1.49 ng/mL,丹参酮 II_A 3 012、301.33、150.67、75.33、30.13、15.07、7.53、1.51 ng/mL 的血浆样品。按“2.3.3”项下方法处理,LC-MS/MS 检测。以被测成分与内标的峰面积的比值为纵坐标(Y),浓度为横坐标(X)进行线性回归,权重系数为 1/X²,得回归方程。同时按信噪比(S/N)=10 计算被测成分的定量限(LOQ)。结果见表 2。

(3) 精密度试验:取空白血浆 120 μL,加入不同质量浓度混合对照品工作液 30 μL,配制成高、中、低 3 种质量浓度的质控样品,每个质量浓度制备 5 份,按“2.3.3”项下方法进行处理,进样分析,测定日内精密度。同法,每天制备、处理 3 种质量浓度的质控样品,连续测定 5 d,LC-MS/MS 检测,计算日间精密度。结果见表 3。

(4) 提取回收率试验:按“精密度试验”中方法配制成高、中、低 3 种质量浓度的质控样品,按“2.3.3”项下方法处理,LC-MS/MS 检测,测得的峰面积为 A₁;用流动相配制相同质量浓度的混合对照品溶液,检测并记录峰面积为 A₂,以 2 次峰面积之比(A₁/A₂)计算提取回收率。结果见表 3。

(5) 稳定性试验:考察二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A 高、中、低 3 种质量浓度的样品在不同条件下的稳定性(n=5)。结果表明,样品在室温放置 8 h(RSD 4.27%~12.52%)、4 °C 放置 24 h(RSD 3.63%~10.10%)、反复冻融 3 次(RSD 4.53%~8.79%)以及-70 °C 保存 20 d 后(RSD

表 1 丹参二萜醌组分中 4 种主要活性成分及内标的主要质谱检测参数
Table 1 MS parameters of four active constituents and internal standard in SMDQC

化合物	相对分子质量	MRM 监测离子 (m/z)	锥孔电压 / V	碰撞能量 / eV	保留时间 / min
克拉霉素	747	748.58→158.11	28	26	0.96
二氢丹参酮 I	278	279.16→189.80	28	34	2.01
隐丹参酮	296	297.16→251.12	34	28	3.03
丹参酮 I	276	277.16→177.98	32	36	3.09
丹参酮 II _A	294	295.16→191.00	30	42	4.96

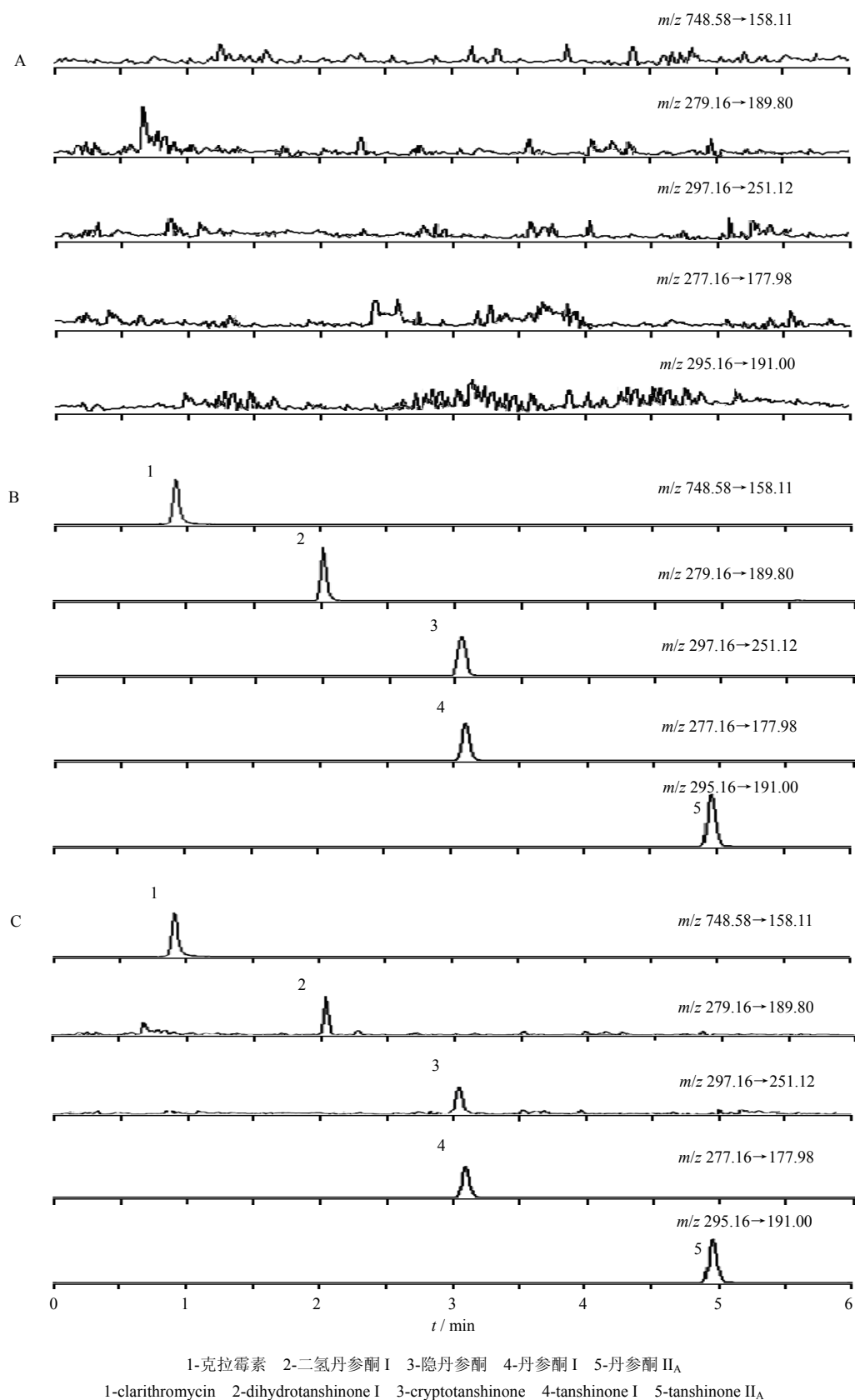


图1 大鼠空白血浆 (A)、空白血浆+对照品+内标 (B) 和给药后 1 h 血浆样品 (C) 中丹参二萜醌组分各主要成分的 MRM 色谱图
 Fig. 1 MRM chromatograms of main constituents in SMDQC in rat blank plasma (A), blank plasma + control + internal standard (B), and blank plasma after treatment (C)

表2 丹参二萜醌组分中4种主要活性成分的线性方程及定量限

Table 2 Calibration curves and LOQ of four active constituents in SMDQC

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围 / (ng·mL ⁻¹)	定量限 / (ng·mL ⁻¹)
二氢丹参酮 I	$Y=0.045 X+0.031$	0.997 4	1.50~3 000.00	1.50
隐丹参酮	$Y=0.049 X+0.014$	0.998 7	1.50~2 993.00	1.50
丹参酮 I	$Y=0.027 X+0.024$	0.998 3	1.49~2 987.00	1.49
丹参酮 II _A	$Y=0.058 X+0.033$	0.999 1	1.51~3 013.00	1.51

表3 丹参二萜醌组分中4个主要成分的精密密度、提取回收率及基质效应 (*n*=5)Table 3 Precisions, extraction recoveries, and matrix effects of four constituents in SMDQC (*n* = 5)

成分	ρ / (ng·mL ⁻¹)	精密密度 RSD / %		提取回收率 / %	基质效应 / %
		日内	日间		
二氢丹参酮 I	300	4.5	4.1	81.76±3.78	103.24±2.38
	75	6.7	7.8	78.23±5.47	98.76±1.49
	7.5	9.3	11.5	75.72±8.98	101.35±3.75
隐丹参酮	299	4.6	3.1	76.17±4.16	99.27±1.64
	74	5.9	7.7	78.67±7.63	98.14±4.76
	7.4	8.4	11.1	74.49±9.26	95.02±7.81
丹参酮 I	298	7.6	5.6	79.13±6.74	98.74±5.13
	74	4.2	4.4	82.53±5.28	102.21±2.09
	7.4	10.8	9.5	74.84±8.05	101.34±1.26
丹参酮 II _A	301	3.9	7.5	85.29±4.10	97.83±4.59
	75	6.8	5.4	80.36±8.35	96.56±2.07
	7.5	12.7	14.6	81.87±5.53	97.39±5.79

5.24%~12.78%), 样品稳定性仍良好。

(6) 基质效应考察: 取空白血浆 150 μ L, 按“2.3.3”项下方法处理后加入不同质量浓度的混合对照品溶液, 配制高、中、低3种质量浓度的样品, 进样, LC-MS/MS 检测分析, 记录峰面积 A_1 ; 用流动相配制相同质量浓度的混合对照品溶液, 检测并记录峰面积为 A_2 , 以2次峰面积之比 (A_1/A_2) 计算基质效应。结果见表3。

2.4 药动学研究

大鼠 ig 给予丹参二萜醌组分固体分散体微丸及其原料药后, 测定4个主要成分二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A 的血药浓度, 以血药浓度 (C) 对时间 (t) 以及半对数血药浓度 ($\ln C$) 对时间 (t) 作图, 得到各成分的血药浓度-时间曲线 (图2)。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 统计分析软件处理, 采用 DAS 2.1.1 软件对血药浓度数据进行分析, 非房室模型方法计算统计矩参数。药动学主要参数见表4。

3 讨论

本实验采用 UPLC-MS/MS 技术, 建立大鼠血浆中丹参二萜醌组分中4个代表性成分二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮及丹参酮 II_A 的测定方法, 结果表明, 该方法专属性强, 灵敏度高, 分析时间短, 适用于丹参二萜醌组分及其制剂的多成分药动学研究。

丹参二萜醌组分在水中的溶解度极低, 导致其口服生物利用度低下。为了提高丹参二萜醌组分的生物利用度, 将其制备成固体分散体微丸^[10]。本实验采用非房室模型方法计算统计矩参数, 比较了丹参二萜醌组分原料药及其固体分散体微丸的 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 。结果表明, 与其原料药相比, 固体分散体微丸的生物利用度得以提高, 4个主要成分的生物利用度提高1.38倍以上; $C_{\max}$ 也有显著提高。固体分散技术使丹参二萜醌组分高度分散, 增加了其溶解度和溶出速率; 而微丸口服进入胃肠道后, 分布面积广, 增加了与胃肠道的接触面积, 最终提高了

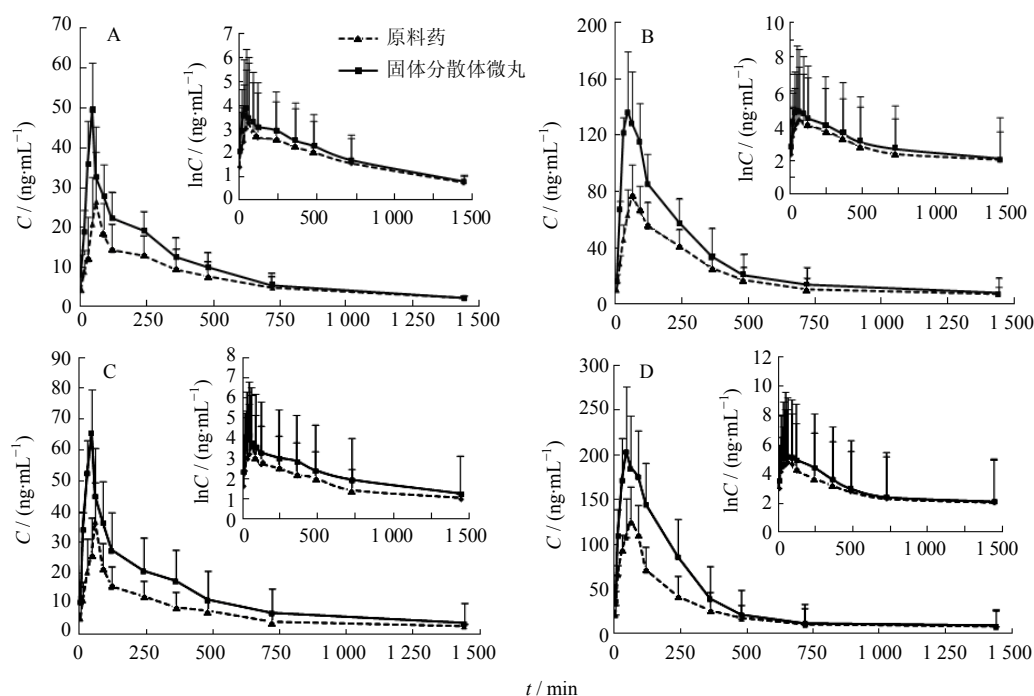


图2 丹参二萜醌组分固体分散体微丸及其原料药丹参酮 II_A (A)、丹参酮 I (B)、隐丹参酮 (C)、二氢丹参酮 I (D) 的药时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Concentration-time curves of dihydrotanshinone I (A), tanshinone I (B), cryptotanshinone (C), and tanshinone II_A (D) in SMDQC and its SDMP ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表4 丹参二萜醌组分固体分散体微丸及其原料药中4个主要成分的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Main pharmacokinetic parameters of four main constituents in SMDQC and its SDMP ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参 数	单 位	二氢丹参酮I		丹参酮I		隐丹参酮		丹参酮II _A	
		原料药	微丸	原料药	微丸	原料药	微丸	原料药	微丸
$C_{\max}$	ng·mL ⁻¹	26.30±6.83	48.35±10.08*	77.65±14.53	136.40±32.43*	34.80±5.37	65.27±14.36*	126.80±26.28	205.65±37.25*
$t_{\max}$	min	57.50±27.75	45.00±20.49	57.50±29.76	42.50±21.8	60.00±31.12	47.50±25.4	55.00±29.91	42.50±17.17
$t_{1/2}$	min	226.99±97.19	338.62±112.01	199.55±47.27	349.12±192.71	195.73±17.24	241.00±62.29	277.00±60.39	189.63±43.22
AUC_{0-t}	mg·mL ⁻¹ ·min	5.50±1.47	10.73±2.08	25.10±4.14	37.25±8.92	5.25±1.10	12.32±2.62	30.84±7.01	62.57±10.31
$AUC_{0-\infty}$	mg·mL ⁻¹ ·min	8.15±1.57	11.31±1.96*	26.23±4.41	40.38±7.37*	7.56±1.64	13.52±3.31*	31.64±7.60	64.50±11.68*

与丹参二萜醌组分原料药比较: * $P<0.05$

* $P < 0.05$ vs SMDQC group

组分的生物利用度,促进了吸收,这些可能是产生上述结果的原因。

中药组分是多成分的集合体,对中药组分及其制剂的药动学评价不能局限于某1个活性成分。如何基于中医药整体观,系统评价中药及复方的药动学特征,仍是当前中药及复方药动学研究亟待解决的问题^[11]。本研究从代表丹参二萜醌组分整体性质的主要成分入手,初步分析其在大鼠体内的药动学特征,为后期丹参二萜醌组分及其制剂多成分整合药动学评价奠定基础。

参考文献

- [1] 贾晓斌,陈彦,李霞,等. 中药复方物质基础研究新思路和方法 [J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(5): 420-425.
- [2] 郁丹红,刘丹,贾晓斌,等. 基于组分层次的中药多元释药系统评价体系的构建 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(17): 2667-2671.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [4] 梁勇,羊裔明,袁淑兰,等. 丹参酮药理及临床应用研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(4): 304-306.
- [5] 杨志霞,林谦,马利. 丹参对心血管疾病药理作用的文献研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2012, 7(2): 93-96.

- [6] Li X, Li X, Wang L, *et al.* Simultaneous determination of danshensu, ferulic acid, cryptotanshinone and tanshinone II_A in rabbit plasma by HPLC and their pharmacokinetic application in danxiongfang [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(5): 1106-1112.
- [7] Song M, Hanga T J, Zhanga Z X, *et al.* Effects of the coexisting diterpenoid tanshinones on the pharmacokinetics of cryptotanshinone and tanshinone II_A in rat [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2007, 32(4/5): 247-253.
- [8] Hao H P, Wang G J, Li P, *et al.* Simultaneous quantification of cryptotanshinone and its active metabolite tanshinone II_A in plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40(2): 382-388.
- [9] Li J, Wang G J, Li P, *et al.* Simultaneous determination of tanshinone II_A and cryptotanshinone in rat plasma by liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2005, 826(1/2): 26-30.
- [10] 郁丹红, 刘 丹, 贾晓斌, 等. 基于生物药剂学性质的中药组分剂型的设计技术 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(17): 2993-2996.
- [11] 郝海平, 郑超滴, 王广基. 多组分、多靶点中药整体药代动力学研究的思考与探索 [J]. 药学报, 2009, 44(3): 270-275.