

阿司匹林与丹红注射液的药动学相互作用特征研究

李建萍^{1,2}, 徐雪君^{1,2}, 张沁瑜^{1,2}, 郭建明^{1,2*}, 段金廛^{1,2*}

1. 南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

2. 南京中医药大学 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 阿司匹林与丹红注射液临床联合用药频率高, 但潜在的药物相互作用尚未完全阐明。探讨阿司匹林与丹红注射液的药动学相互作用特征。**方法** 建立同时定量检测血浆样品中水杨酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、迷迭香酸和丹参素的 UHPLC-MS/MS 分析方法, 评价阿司匹林与丹红注射液联用对彼此药动学的影响。应用酶水解结合 UHPLC-MS/MS 分析方法同时测定尿液样品中水杨酸、龙胆酸、*O*-羟基马尿酸、水杨酸酚基葡萄糖醛酸苷和 *O*-羟基马尿酸酚基葡萄糖醛酸苷的含量, 评价药物相互作用对阿司匹林代谢产物肾脏排泄的影响。测定血浆血栓烷 B₂ (thromboxane B₂, TXB₂) 和 6-酮-前列腺素 F_{1α} (6-keto-PGF_{1α}) 水平, 评价药物相互作用对阿司匹林抗血小板作用的影响。**结果** 阿司匹林与丹红注射液相互作用显著影响阿司匹林水解产物水杨酸的代谢动力学, 导致水杨酸血药浓度显著增加, 肾脏排泄显著减少, 但对丹红注射液中主要丹酚酸类成分的代谢动力学无显著影响。血液循环中增加的水杨酸会通过转化为其他代谢产物进行代偿性排泄, 导致龙胆酸、*O*-羟基马尿酸、水杨酸酚基葡萄糖醛酸苷和 *O*-羟基马尿酸酚基葡萄糖醛酸苷的肾脏排泄总量显著增加。此外, 阿司匹林与丹红注射液联用不会拮抗阿司匹林的抗血小板作用。**结论** 阿司匹林与丹红注射液联用导致水杨酸血药浓度增加, 肾脏排泄减少, 血液循环中增加的水杨酸会通过转化成其他代谢产物从肾脏排泄。

关键词: 阿司匹林; 丹红注射液; 药物相互作用; 水杨酸; 马尿酸; 丹酚酸

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)12-3619-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.12.019

Characteristics of pharmacokinetics interaction between aspirin and Danhong Injection

LI Jian-ping^{1,2}, XU Xue-jun^{1,2}, ZHANG Qin-yu^{1,2}, GUO Jian-ming^{1,2}, DUAN Jin-ao^{1,2}

1. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective Aspirin (acetylsalicylic acid, ASA) and Danhong Injection (丹红注射液, DHI) are widely used in combination in clinic for the treatment of cerebral infarction and coronary heart diseases in China. However, the interaction between ASA and DHI remains largely undefined. The purpose of this study is to explore the characteristics of pharmacokinetics interaction between ASA and DHI. **Methods** Method based on UHPLC-MS/MS was established to simultaneously quantify the concentrations of salicylic acid, salvianolic acid A, salvianolic acid B, rosmarinic acid, and tanshinol in plasma. Enzymatic hydrolysis and UHPLC-MS/MS analysis method were applied to simultaneously quantify the contents of salicylic acid, gentisic acid, salicylic acid, salicyl phenolic glucuronide, and salicylic acid phenolic glucuronide in urine. Plasma concentrations of thromboxane B₂ (TXB₂) and 6-ketone-prostaglandin F_{1α} (6-keto-PGF_{1α}) were determined to evaluate the anti-platelet function. **Results** Drug-herb interaction of ASA and DHI significantly influenced the pharmacokinetics profile of salicylic acid, the hydrolytic metabolite of ASA,

收稿日期: 2020-10-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81803795); 江苏省自然科学基金项目 (BK20180823); 南京中医药大学自然科学基金青年项目 (NZY81803795); 江苏省高等学校自然科学研究面上项目 (18KJB360003)

作者简介: 李建萍 (1989—), 女, 讲师, 研究方向为药物相互作用。E-mail: jianpingli@njucm.edu.cn

*通信作者: 郭建明 (1979—), 男, 教授。E-mail: njuguo@njucm.edu.cn

段金廛 (1956—), 男, 教授。E-mail: dja@njucm.edu.cn

which was characterized by increased plasma concentration while decreased renal excretion of salicylic acid. However, the pharmacokinetics profiles of salvianolic acids in DHI were not significantly changed. Furthermore, the total content of renal excretion of gentisic acid, salicyluric acid, salicyl phenolic glucuronide and salicyluric acid phenolic glucuronide were significantly increased. **Conclusion** Drug-herb interaction of ASA and DHI increased the plasma concentration while decreased the renal excretion of salicylic acid, the increased salicylic acid in blood circulation would be transferred to other metabolites.

Key words: aspirin (acetylsalicylic acid); Danhong Injection; drug-drug interaction; salicylic acid; hippuric acid; salvianolic acid

药物相互作用是指2种或者2种以上的药物联合使用时药物之间产生的相互影响,主要包括药效相互作用和药动学相互作用。潜在的药物相互作用会对药物的安全性和有效性产生巨大的影响。例如,米贝拉地尔与辛伐他汀联合用药会产生横纹肌溶解的风险,因为米贝拉地尔可显著抑制细胞色素P450酶的代谢能力,导致辛伐他汀的暴露量增加,在无法控制药物相互作用风险的情况下,米贝拉地尔已经被撤出了医药市场^[1]。又如,丙磺舒与青霉素联合用药会产生抗菌作用增强的效应,因为丙磺舒可显著抑制有机阴离子转运体的转运功能,导致青霉素的排泄减少^[2]。因此,明确潜在的药物相互作用及机制,对于确保临床用药的安全性和有效性具有重要意义。

阿司匹林 (aspirin, acetylsalicylic acid) 是经典的解热镇痛、抗炎药,小剂量阿司匹林 (<325 mg/d, 其中 100 mg/d 是最为常用的剂量) 被认为是“关键和基础”的抗血小板药物,临床上广泛用于治疗心绞痛、缺血性心脏病、心肌梗死、脑血栓等疾病。丹红注射液 (Danhong Injection, DHI) 由丹参和红花2味中药组成,主要功效是活血化瘀、通脉舒络,临床广泛用于治疗冠心病、心绞痛、心肌梗死、脑血栓等疾病。丹红注射液和阿司匹林是治疗心脑血管疾病的中西药代表,临床联合用药频率很高。有学者基于医院信息系统分析丹红注射液的联合用药情况,发现与丹红注射液联合使用的最常用药物就是阿司匹林,联合使用频次高达90%以上^[3]。在丹红注射液与阿司匹林高频率联合用药的情况下,药物相互作用对用药安全性和有效性带来的影响也将是广泛的。

本课题组前期采用代谢组学结合多变量数据分析的方法发现阿司匹林与丹红注射液之间存在药物相互作用^[4];丹红注射液可以通过促进胃黏液分泌、降低胃蛋白酶活性以及降低活性氧簇水平来减轻阿司匹林引起的胃黏膜损伤^[5];丹红注射液可以通过抑制有机阴离子转运体的基因转录、蛋白表达以及转运功能来减少水杨酸的肾脏排泄^[6]。本研究基于药动学相互作用,进一步探讨阿司匹林与丹红注射液的药物

相互作用特征,评价阿司匹林与丹红注射液联合使用对丹红注射液中主要丹酚酸类成分药动学的影响,以及对阿司匹林主要代谢产物肾脏排泄的影响。

1 材料

1.1 动物

SPF级雄性SD大鼠,12周龄,体质量350~400 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号SCXK(京)2012-0001。大鼠饲养在南京中医药大学药物安全性评价中心,环境温度为18~29℃,相对湿度为40%~70%,采光条件为12 h明/12 h暗,照度为150~300 lx。所有动物实验均符合南京中医药大学动物伦理委员会的标准(批准号201805A023)。

1.2 药品、试剂与仪器

阿司匹林原料药(质量分数>99%,批号27383)购自阿拉丁化学有限公司,每天给药前用蒸馏水配制成质量浓度为3.2 mg/mL的溶液。丹红注射液(10 mL/支,批号15081038)由菏泽步长制药有限公司提供。对照品水杨酸(质量分数>99%,批号BW2024)、丹酚酸A(质量分数>98%,批号PCS0265)、丹酚酸B(质量分数>99%,批号BW1690)、迷迭香酸(质量分数>99%,批号BW2065)、丹参素(质量分数>98%,批号BW1693)、龙胆酸(质量分数>98%,批号SH-1022)、O-羟基马尿酸(质量分数>98%,批号SH-B25661)、氯霉素(质量分数>98%,批号BW1830)以及盐酸苯海拉明(质量分数C>98%,批号BW2015)均购自中国食品药品检定研究院。

β -葡萄糖醛酸酶(批号G0251)购自美国Sigma-Aldrich Co. LLC。 β -葡萄糖醛酸酶常用于水解酚基葡萄糖醛酸苷,1个Sigma单位的 β -葡萄糖醛酸酶在适宜的孵育条件下(pH 5.0, 37℃)每小时能从酚基葡萄糖醛酸苷中水解出1.0 μ g的酚基。血栓烷B₂ (thromboxane B₂, TXB₂, 批号B001)和6-酮-前列腺素F_{1 α} (6-keto-PGF_{1 α} , 批号H204)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

Microfuge 22R 台式微量冷冻离心机(美国贝克

曼库尔特公司); ML204 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); PV-1 迷你涡旋混匀器(英国格兰特公司); TS100 恒温混匀仪(杭州瑞诚仪器有限公司)。

2 方法

2.1 分组及给药

将 24 只大鼠随机分为空白组、阿司匹林组、丹红注射液组和阿司匹林-丹红注射液联合使用组, 每组 6 只。空白组大鼠每天规律给水喂食; 阿司匹林组大鼠每天 ig 阿司匹林溶液 1 次 (10.41 mg/kg), 连续 ig 14 d; 丹红注射液组大鼠每天尾 iv 丹红注射液 1 次 (4.16 mL/kg), 连续注射 14 d; 联合使用组大鼠每天尾 iv 丹红注射液 (4.16 mL/kg) 后立即 ig 阿司匹林溶液 (10.41 mg/kg), 连续给药 14 d。阿司匹林和丹红注射液每天的给药剂量相当于体质量 60 kg 的患者每天服用 100 mg 的阿司匹林或者滴注 40 mL 的丹红注射液^[7]。大鼠尾 iv 丹红注射液的速度控制在 1 mL/min。动物实验共进行 3 个批次, 其中 1 个批次用于采集血浆样品, 测定血浆样品中水杨酸及 4 种丹酚酸的含量; 第 2 个批次用于收集尿液样品, 测定尿液样品中 5 种阿司匹林代谢产物的含量; 第 3 个批次用于采集血浆样品, 测定血浆样品中 TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1α} 水平。

2.2 血浆样品的采集与处理

第 14 天给药结束后将所有大鼠禁食 12 h, 第 15 天各组大鼠按照规定的给药方式分别进行给药, 给药后 1、5、15、30、45 min 及 1、1.5、2、4、6、9、12、24 h 分别从眼球后静脉丛取血, 每次的取血体积为 0.3 mL, 血液样品置于装有 33 μL 枸橼酸钠溶液 (3.8%) 的离心管中。取血过程中每隔 2 h ip 一次生理盐水, 补充大鼠的循环血量^[8]。

将血液样品离心 (15 000×g, 10 min) 后, 取

上清液, 获得血浆样品。取 100 μL 血浆样品置于新的离心管中, 加入 100 μL 内标溶液和 200 μL 甲醇溶液, 充分涡旋 30 s 后离心 (15 000×g, 10 min), 取上清液用于 UHPLC-MS/MS 分析。氯霉素和苯海拉明分别为 ESI⁺ 和 ESI⁻ 模式的内标, 配制溶剂为甲醇, 质量浓度分别为 1.66、0.71 μg/mL。选择氯霉素和苯海拉明作为内标的原因有 3 个: (1) 在血浆样品处理和色谱分析过程中氯霉素和苯海拉明非常稳定; (2) 氯霉素和苯海拉明的色谱保留时间与分析物接近; (3) 氯霉素和苯海拉明的响应不会对分析物的测定产生干扰。

2.3 UHPLC-MS/MS 同时测定血浆样品中水杨酸及 4 种丹酚酸的含量

应用 Acquity UHPLCTM 系统 (Waters Corp., Milford, MA, USA) 进行色谱分析。使用的色谱柱为 UHPLC BEH C₁₈ 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)。柱温和自动进样器的温度分别控制在 35、4 °C。流动相: 甲酸-水溶液 (1:1000, A) 和乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~1 min, 3% B; 1~6 min, 3%~40% B; 6~8 min, 40%~95% B; 8~9 min, 95% B; 9~9.2 min, 95%~97% B。进样体积为 5 μL。

应用 Xevo Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Waters Corp., Milford, MA, USA) 进行质谱分析。检测参数设置: 毛细管电压 3.0 kV, 离子源温度 150 °C, 脱溶剂温度 550 °C, 锥孔气流速度 50 L/h, 脱溶剂气流速度 1000 L/h。水杨酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、迷迭香酸和丹参素的最佳检测条件见表 1。

配制含有水杨酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、迷迭香酸及丹参素的质控样品 (高、中、低 3 个浓度水平), 根据美国食品药品监督管理局 (FDA) 的生物分

表 1 水杨酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、迷迭香酸、丹参素、氯霉素和苯海拉明的 UHPLC-MS/MS 分析最佳检测条件
Table 1 Optimal detection conditions for salicylic acid, salvianolic acid A, salvianolic acid B, rosmarinic acid, tanshinol, chlormycetin, and diphenhydramine by UHPLC-MS/MS analysis

分析物	离子化模式	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	锥孔电压/kV	碰撞能量/eV	<i>t_R</i> /min
水杨酸	ESI ⁺	138.83	65.08	18.0	22.0	5.35
丹酚酸 A	ESI ⁻	493.16	295.09	28.0	18.0	5.64
丹酚酸 B	ESI ⁻	717.29	519.17	26.0	18.0	5.93
迷迭香酸	ESI ⁻	359.22	197.06	30.0	16.0	5.13
丹参素	ESI ⁺	199.08	153.03	10.0	6.0	2.51
氯霉素	ESI ⁻	321.10	151.80	24.0	18.0	5.41
苯海拉明	ESI ⁺	256.21	167.13	24.0	46.0	5.95

析方法验证指南进行方法学考察,方法学考察包括选择性、准确度、精密度、回收率、基质效应、稳定性和标准曲线。

2.4 尿液样品的收集与处理

第14天给药结束后将大鼠放入代谢笼,收集24h的尿液样品,并记录尿液样品的体积。整个尿液收集过程中尿液收集管都置于冰上。收集的尿液样品立即离心(800×g、10 min),取上清液置于-80℃冰箱保存备用。

2.5 酶水解结合UHPLC-MS/MS法测定尿液样品中阿司匹林5种代谢产物的含量

色谱及质谱分析条件及方法学考察参考本课题组前期建立的方法^[9]。

水杨酸酚基葡萄糖醛酸苷和O-羟基马尿酸酚基葡萄糖醛酸苷的对照品无法通过商业化途径获得,因此,无法通过仪器分析方法直接测定尿液样品中的含量。但是,可以应用本课题组前期建立的酶水解结合UHPLC-MS/MS的分析方法,将水杨酸酚基葡萄糖醛酸苷和O-羟基马尿酸酚基葡萄糖醛酸苷用β-葡萄糖醛酸酶水解,通过测定释放的水杨酸和O-羟基马尿酸的含量,来间接测定尿液样品中水杨酸酚基葡萄糖醛酸苷和O-羟基马尿酸酚基葡萄糖醛酸苷的含量。具体方法如下:(1)建立水杨酸酚基葡萄糖醛酸苷和O-羟基马尿酸酚基葡萄糖醛酸苷的UHPLC-MS/MS检测方法。采用阿司匹林的尿液样品(该尿液样品中含有水杨酸酚基葡萄糖醛酸苷和O-羟基马尿酸酚基葡萄糖醛酸苷),根据水杨酸酚基葡萄糖醛酸苷和O-羟基马尿酸酚基葡萄糖醛酸苷的结构式和相对分子质量,对离子检测模式、母离子、子离子、锥孔电压及碰撞能量等质谱参数进行优化,最终确定水杨酸酚基葡萄糖醛酸苷的最佳检测条件:(ESI⁻) m/z 313→ m/z 137,锥孔电压20 kV,碰撞能量15 eV,保留时间1.68 min;O-羟基马尿酸酚基葡萄糖醛酸苷的最佳检测条件:(ESI⁺) m/z 372→ m/z 196,锥孔电压10 kV,碰撞能量10 eV,保留时间1.40 min。(2)优化酶解时间以确保水杨酸酚基葡萄糖醛酸苷和O-羟基马尿酸酚基葡萄糖醛酸苷完全水解。在β-葡萄糖醛酸酶浓度为10 kU/mL以及温度为37℃的反应条件下,水杨酸酚基葡萄糖醛酸苷经过4h的酶解反应可以完全水解为水杨酸,O-羟基马尿酸酚基葡萄糖醛酸苷经过8h的酶解反应可以完全水解为O-羟基马尿酸。因此,将酶解时间设定为8h可以确保水

杨酸酚基葡萄糖醛酸苷和O-羟基马尿酸酚基葡萄糖醛酸苷均完全水解。(3)样品分析与数据处理,从同一份尿液样品中制备2份完全相同的检测样本,一份直接用于UHPLC-MS/MS分析,测定尿液样品中水杨酸、龙胆酸和O-羟基马尿酸的含量。另一份酶水解后用于UHPLC-MS/MS分析,测定尿液样品中水杨酸和O-羟基马尿酸的总量,根据酶解反应尿液样品与非酶解反应尿液样品的分析结果,计算水杨酸和O-羟基马尿酸增加的浓度,分别就是尿液样品中水杨酸酚基葡萄糖醛酸苷和O-羟基马尿酸酚基葡萄糖醛酸苷的浓度^[9]。

2.6 血浆样品中TXB₂和6-keto-PGF_{1α}水平的测定

第14天给药结束后,所有大鼠禁食24h。第15天用10%水合氯醛溶液将所有大鼠麻醉(0.3 mL/100 g),进行颈总动脉取血。血液样品置于装有枸橼酸钠溶液(3.8%)的离心管中,离心(15 000×g、10 min)后取上清液获得血浆样品。采用TXB₂和6-keto-PGF_{1α}试剂盒测定血浆TXB₂和6-keto-PGF_{1α}水平,具体操作过程参见试剂盒说明书。

2.7 数据处理

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ ($n=6$)表示。采用DAS 2.0计算各分析物的药动学参数。采用Nonparametric Mann-Whitney Test分析组间差异性, $P<0.05$ 表示显著性差异, $P<0.01$ 表示极显著性差异。

3 结果

3.1 阿司匹林与丹红注射液联合使用对彼此药物代谢动力学的影响

基于UHPLC-MS/MS建立的分析方法能快速分离并定量血浆样品中的水杨酸、丹酚酸A、丹酚酸B、迷迭香酸和丹参素。空白血浆样品中的内源性成分、内标成分不会对目标成分的测定产生干扰,目标成分之间也不会产生相互干扰(图1)。水杨酸、丹酚酸A、丹酚酸B、迷迭香酸和丹参素的准确度(95.47%~102.68%)、精密度(3.66%~14.36%)、回收率(93.13%~108.21%)、基质效应(96.81%~102.49%)和稳定性(91.92%~104.01%)均在限定范围内(表2)。在对应的标准曲线最低浓度水平,各成分均具有良好的仪器响应(信噪比>10,准确度95.47%~103.33%,日内精密度5.00%~11.19%,日间精密度6.58%~12.21%),因此,将各成分标准曲线的最低浓度设定为各自的定量下限。水杨酸、丹酚酸A、丹酚酸B、迷迭香酸和丹参素的标准曲线、相关系数、线性范围和定量下限见表3。方法

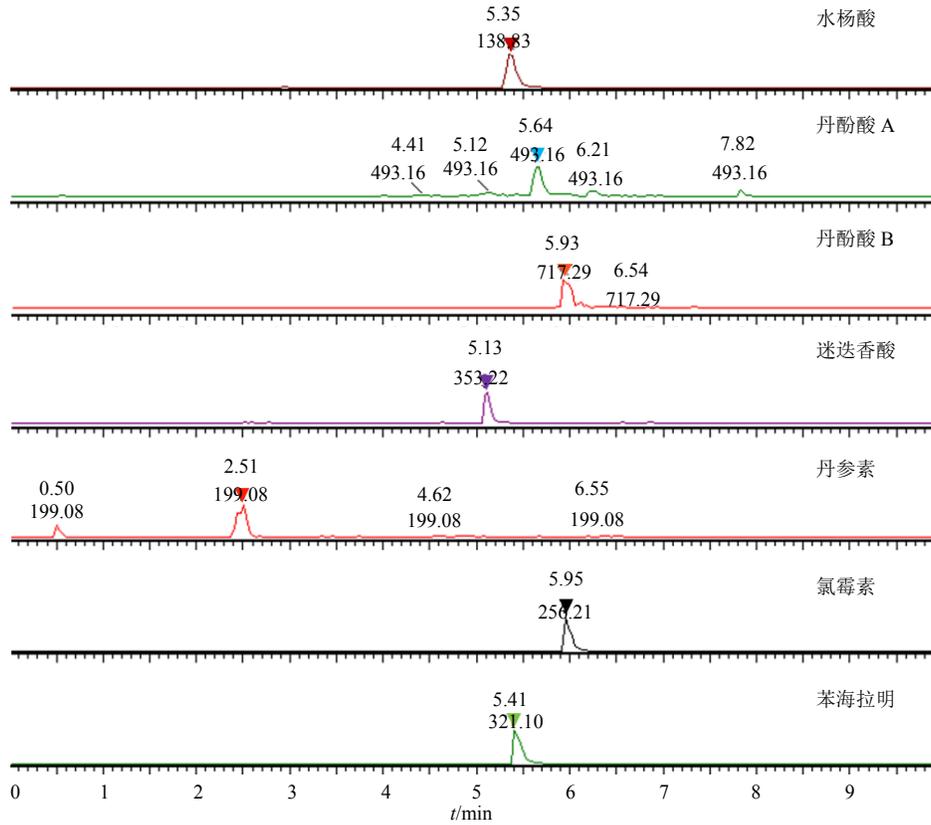


图1 水杨酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、迷迭香酸、丹参素、氯霉素和苯海拉明的 UHPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 1 UHPLC-MS/MS chromatograms of salicylic acid, salvianolic acid A, salvianolic acid B, rosmarinic acid, tanshinol, chlormycetin and diphenhydramine

表 2 水杨酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、迷迭香酸和丹参素 UHPLC-MS/MS 分析的准确度、精密度、回收率、基质效应和稳定性

Table 2 Accuracy, precision, recovery, matrix effect and stability of salicylic acid, salvianolic acid A, salvianolic acid B, rosmarinic acid, and tanshinol by UHPLC-MS/MS analysis

分析物	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	准确度/%	精密度/%		回收率/%	基质效应/%	稳定性/%			
			日内	日间			短期	长期	进样	冻融
水杨酸	51.20	98.56	3.66	4.19	93.81	97.43	96.69	97.19	96.75	96.04
	5.12	101.73	6.30	9.92	93.13	99.86	97.03	96.77	97.34	98.36
	0.51	99.35	7.16	8.03	95.54	97.35	99.21	97.00	101.56	95.89
丹酚酸 A	350.60	100.28	13.05	14.36	108.21	101.39	97.34	92.19	99.12	94.59
	35.06	98.20	7.39	14.10	101.80	102.49	100.43	91.92	98.09	97.89
	3.51	97.86	11.19	12.21	92.28	97.22	96.89	96.27	95.52	101.37
丹酚酸 B	379.10	99.08	7.42	8.11	102.15	96.81	96.30	102.14	96.65	96.35
	37.91	102.68	3.73	9.06	93.70	100.94	101.05	93.43	101.00	97.07
	3.79	95.47	5.00	8.67	96.13	100.11	99.63	96.52	97.94	94.38
迷迭香酸	50.00	100.20	5.41	6.92	107.05	97.05	104.01	94.51	97.11	95.46
	5.00	95.90	8.75	10.83	93.63	98.70	103.91	97.72	98.67	96.80
丹参素	0.50	101.00	5.95	7.08	96.75	98.21	99.38	95.33	98.14	101.78
	15.00	102.09	4.59	5.37	104.93	98.31	98.62	95.02	102.08	96.17
	1.50	99.56	7.89	8.57	97.87	97.15	98.05	98.67	96.66	98.02
	0.15	103.33	6.14	6.58	93.71	98.54	100.47	95.75	99.67	97.32

表3 水杨酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、迷迭香酸和丹参素 UHPLC-MS/MS 分析的标准曲线、相关系数、线性范围和定量限
Table 3 Calibration curve, correlation coefficient, linear range and limit of quantification of salicylic acid, salvianolic acid A, salvianolic acid B, rosmarinic acid, and tanshinol by UHPLC-MS/MS analysis

分析物	标准曲线	相关系数	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量下限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
水杨酸	$y=16\ 296.08x+36.81$	0.995 0	0.03~51.20	0.030
丹酚酸 A	$y=9\ 250.42x-317.93$	0.993 7	0.064~350.60	0.064
丹酚酸 B	$y=6\ 460.86x-2.82$	0.997 2	0.012~379.10	0.012
迷迭香酸	$y=225.19x+3.13$	0.997 6	0.11~50.00	0.110
丹参素	$y=538.48x-3.93$	0.997 1	0.15~15.00	0.150

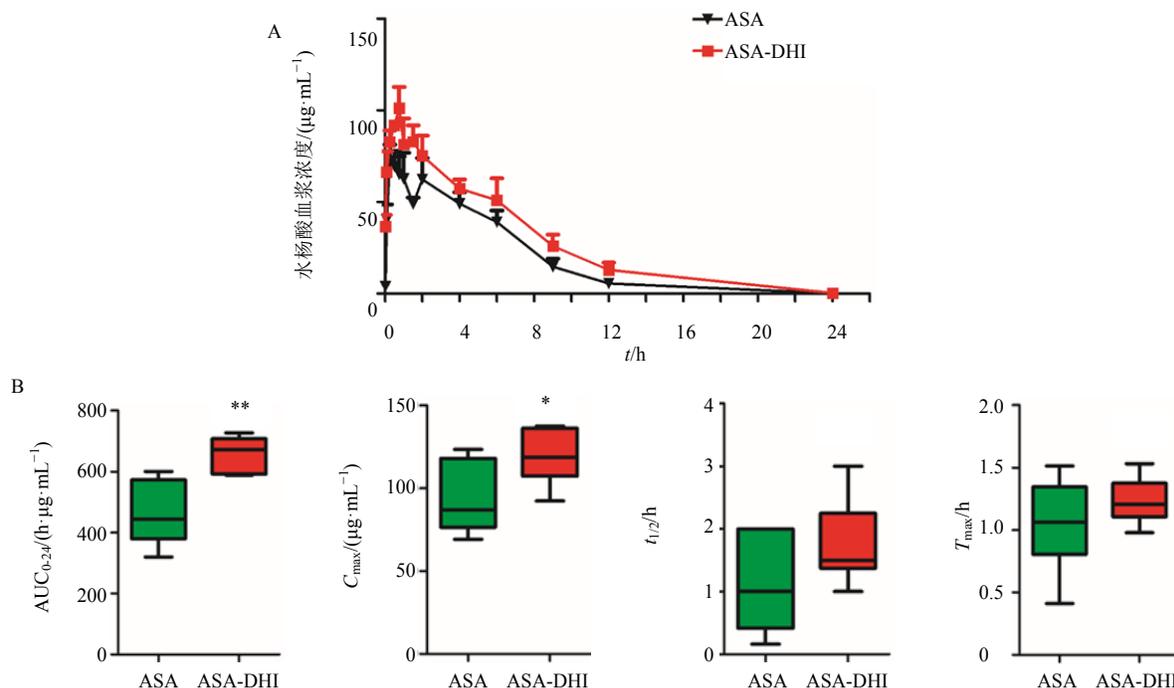
学验证结果显示本方法能准确、精密、稳定、可靠地测定血浆样品中水杨酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、迷迭香酸和丹参素的含量。

阿司匹林与丹红注射液联用主要影响阿司匹林的代谢动力学特征(图 2),对丹红注射液中主要丹酚酸类成分的代谢动力学特征无显著影响(图 3)。阿司匹林在吸收过程中及吸收入血后,会迅速被胃黏膜、血浆、红细胞及肝中的酯酶水解为水杨酸。因此,阿司匹林的药浓度低,血浆半衰期为 15~20 min^[10]。与阿司匹林组相比,联合使用组水杨酸药-时曲线下面积(AUC₀₋₂₄)以及最大血药浓

度(C_{max})均显著增加($P<0.05$,图 2-B)。但是,与丹红注射液组相比,联合使用组丹酚酸 A、丹酚酸 B、迷迭香酸以及丹参素的药-时曲线下面积以及最大血药浓度均无显著变化(图 3)。

3.2 阿司匹林与丹红注射液联合使用对阿司匹林代谢产物肾脏排泄的影响

阿司匹林与丹红注射液联用显著减少水杨酸的肾脏排泄量($P<0.01$,图 4-A),但对阿司匹林其他代谢产物(龙胆酸、O-羟基马尿酸、水杨酸酚基葡萄糖醛酸苷和 O-羟基马尿酸酚基葡萄糖醛酸苷)的肾脏排泄无显著影响(图 4-A)。

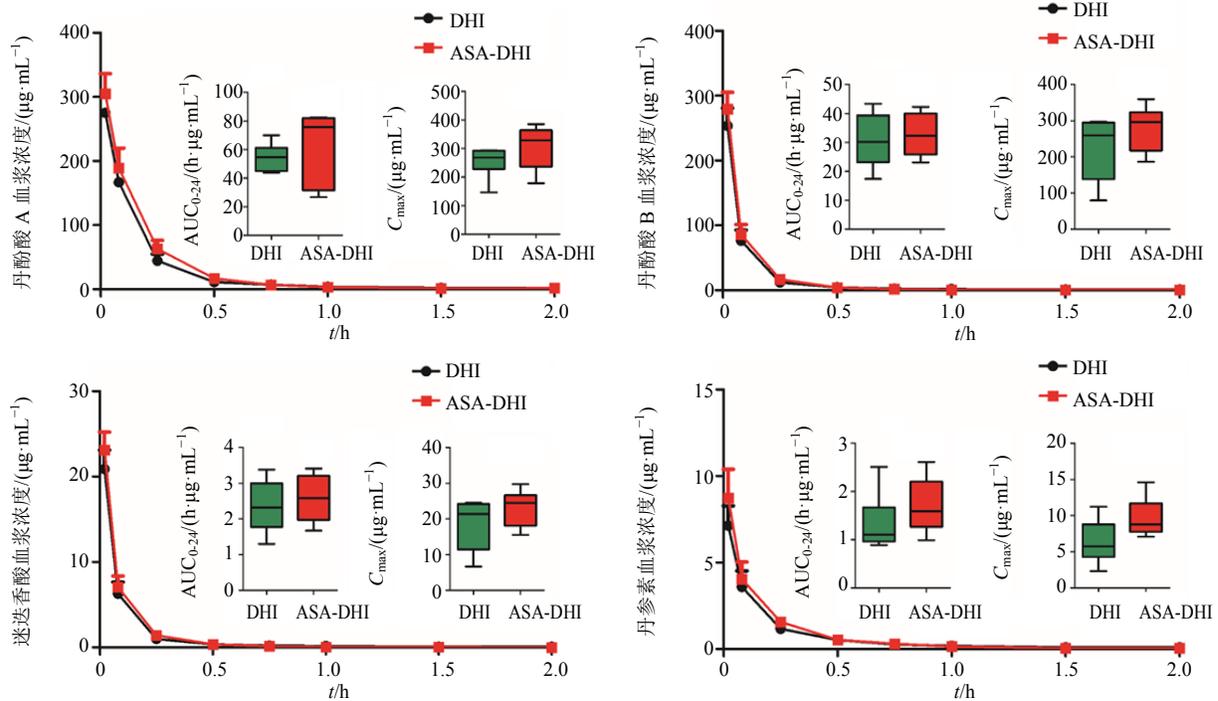


ASA-阿司匹林组 ASA-DHI-阿司匹林与丹红注射液联合使用组,下同;A-水杨酸的浓度-时间曲线 B-水杨酸的药动学参数 与阿司匹林组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

ASA-acetylsalicylic acid group ASA-DHI- acetylsalicylic acid + Danhong Injection group, same as below figures; A-concentration-time curve of salicylic acid B-pharmacokinetics parameters of salicylic acid * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs ASA group

图2 阿司匹林与丹红注射液联合使用对阿司匹林水解产物水杨酸代谢动力学特征的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 2 Effect of drug-herb interaction of aspirin and Danhong Injection on pharmacokinetics characteristics of aspirin hydrolyzed salicylic acid ($\bar{x}\pm s, n=6$)

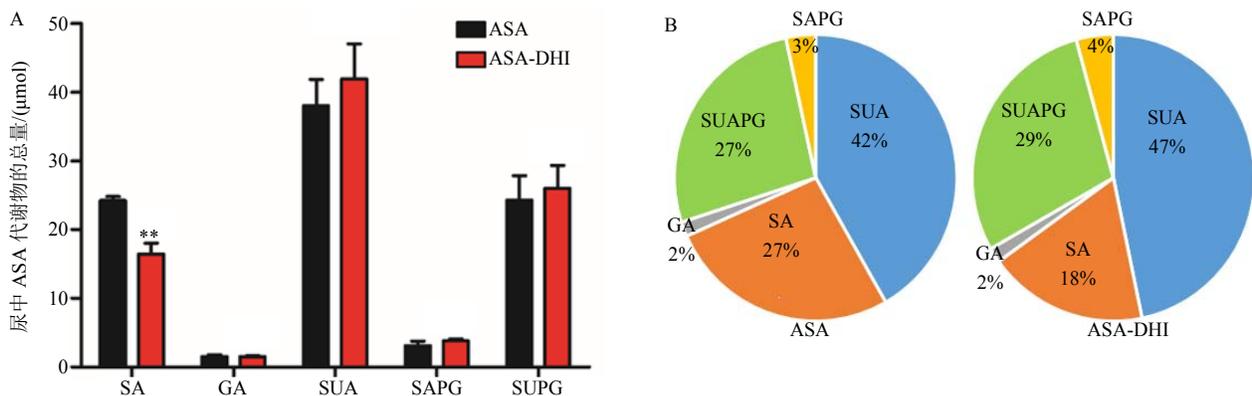


DHI-丹红注射液组, 图5同

DHI-Danhong Injection group, same as below fig. 5

图3 阿司匹林与丹红注射液联合使用对丹红注射液中主要丹酚酸的代谢动力学特征的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of drug-herb interaction of aspirin and Danhong Injection on metabolic kinetic characteristics of main salicylic acids in Danhong Injection ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



与阿司匹林组比较: ** $P < 0.01$ SA-水杨酸 GA-龙胆酸 SUA-*O*-羟基马尿酸 SAPG-水杨酸酚基葡萄糖醛酸苷 SUAPG-*O*-羟基马尿酸酚基葡萄糖醛酸苷 A-尿液中水杨酸、龙胆酸、*O*-羟基马尿酸、水杨酸酚基葡萄糖醛酸苷、*O*-羟基马尿酸酚基葡萄糖醛酸苷的含量 B-水杨酸、龙胆酸、*O*-羟基马尿酸、水杨酸酚基葡萄糖醛酸苷、*O*-羟基马尿酸酚基葡萄糖醛酸苷在肾排泄总量中的百分比

** $P < 0.01$ vs ASA SA-salicylic acid GA-gentisic acid SUA-salicyluric acid SAPG-salicyl phenolic glucuronide SUAPG-salicyluric acid phenolic glucuronide A-contents of SA, GA, SUA, SAPG, and SUAPG in urine B-percentage of SA, GA, SUA, SAPG and SUAPG in total content of renal excretion

图4 阿司匹林与丹红注射液联合使用对阿司匹林代谢产物肾脏排泄的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of drug-herb interaction of aspirin and Danhong Injection on renal excretion of aspirin metabolites ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

与阿司匹林组相比, 联合使用组水杨酸、龙胆酸、*O*-羟基马尿酸、水杨酸酚基葡萄糖醛酸苷和 *O*-羟基马尿酸酚基葡萄糖醛酸苷这5种代谢产物的肾脏排

泄总量无显著变化 [阿司匹林组 (91.16 ± 15.63) μmol , 联合使用组 (89.70 ± 20.82) μmol]. 但是, 除水杨酸以外的其他4种代谢产物的肾脏排泄量均

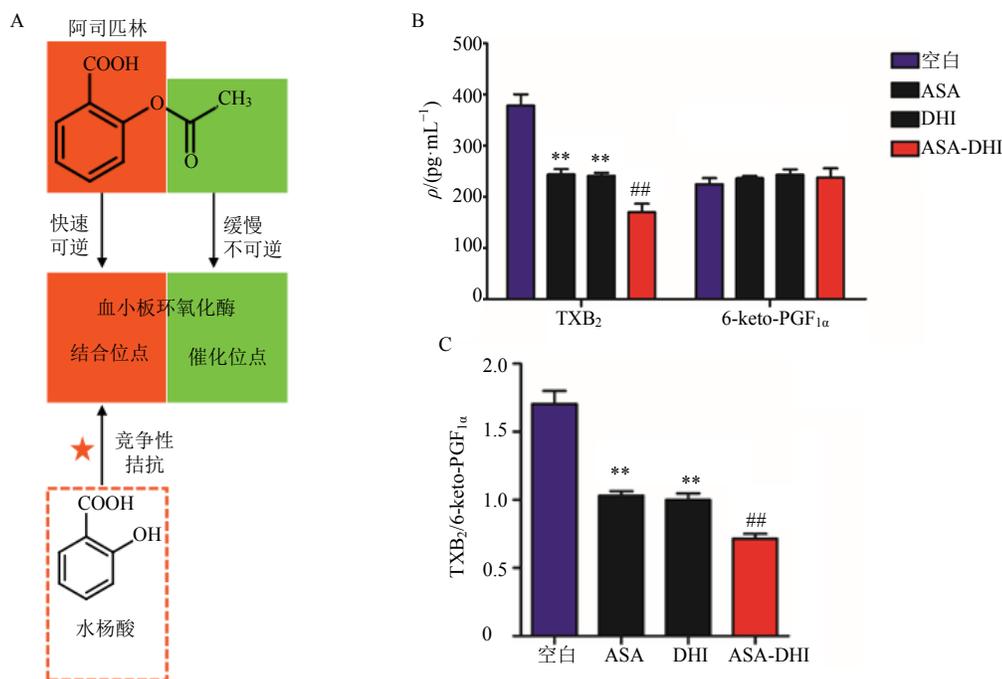
有增加的趋势，将这4种代谢产物的尿液排泄量作为整体进行比较，发现阿司匹林与丹红注射液联用会导致除水杨酸以外的其他4种代谢产物的尿液排泄总量显著增加 [阿司匹林组(66.92±16.44)μmol, 联合使用组(86.65±5.76) μmol], 所占阿司匹林代谢产物肾脏排泄总量的比例也由73%增加到82% (图4-B)。

3.3 阿司匹林与丹红注射液联合使用对阿司匹林抗血小板作用的影响

阿司匹林通过抑制血小板环氧化酶 (cyclooxygenase, COX) 活性, 减少 TXA₂ 生成, 发挥抑制血小板聚集的作用^[11]。阿司匹林通过乙酰化作用抑制 COX 活性被认为是阿司匹林发挥抗血小板作用的关键^[12]。阿司匹林乙酰化血小板 COX 时存在2个独立位点: 一是结合位点 (铁离子-血红素阳离子位点, Fe²⁺-heme cationic site), 阿司匹林首先快速可逆地与铁离子-血红素阳离子位点结合; 阿司匹林与铁离子-血红素阳离子位点的结合过程可以被其他药物竞争性拮抗, 邻羟基苯甲酸是药物拮抗阿司匹林与 COX 结合所需要的最小有效基团^[13-14]。二是催化位点 (丝氨酸残基 530 位点, serine residue

530), 阿司匹林与铁离子-血红素阳离子位点结合后通过对临近的丝氨酸残基 530 位点进行缓慢不可逆的乙酰化作用发挥对 COX 的抑制作用。

水杨酸没有乙酰基团, 因此对 COX 不具有乙酰化作用, 但是水杨酸对阳离子结合位点的亲和力与阿司匹林相当, 因此水杨酸对血小板 COX 也具有微弱的抑制作用^[15]; 在全血中, 阿司匹林抑制 TXA₂ 生成以及抑制血小板聚集的能力分别是水杨酸的 74 倍和 2136 倍^[16]。此外, 与铁离子-血红素阳离子位点的强亲和力导致水杨酸与阿司匹林发生竞争性拮抗, 阻止阿司匹林与铁离子-血红素阳离子位点结合, 进一步阻止阿司匹林对丝氨酸残基 530 位点的催化作用^[12-15]。因此, 阿司匹林是发挥抗血小板作用的有效成分, 当水解为水杨酸之后就几乎失去了抗血小板作用, 而且水杨酸还会浓度相关性地拮抗阿司匹林的抗血小板作用 (图 5-A)^[16]。水杨酸拮抗阿司匹林抗血小板作用伴随着潜在的风险信号, 前期已经有临床研究证实, 除阿司匹林外还服用双氯芬酸、布洛芬以及吲哚美辛等其他非甾体抗炎药的患者, 发生心肌梗死等心血管疾病的风险会增加 2.8 倍^[17-19], 因为这些非甾体抗炎药均会拮抗



A-水杨酸竞争性拮抗阿司匹林抗血小板作用的机制 B-血浆 TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1α} 浓度 C-TXB₂ 与 6-keto-PGF_{1α} 的比值 与空白组比较: **P<0.01 与阿司匹林组或丹红注射液组比较: ##P<0.01

A-mechanism of salicylic acid competitively antagonizing the antiplatelet effect of aspirin B-plasma concentration of TXB₂ and 6-keto-PGF_{1α} C-ratio of TXB₂ to 6-keto-PGF_{1α} **P<0.01 vs CTL group ##P<0.01 vs ASA or DHI group

图5 阿司匹林与丹红注射液联合使用对阿司匹林抗血小板作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effect of drug-herb interaction of aspirin and Danhong Injection on antiplatelet effect of aspirin ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

还原成前列腺素 H₂ (PGH₂), PGH₂ 在血栓合酶作用下生成血栓素 A₂ (thromboxane A₂, TXA₂), 在前列环素合酶作用下生成前列环素 I₂ (PGI₂), TXA₂ 具有诱导血小板聚集和缩血管作用, 而 PGI₂ 具有抗血小板聚集和舒血管作用, 血小板聚集和解聚过程受 TXA₂ 和 PGI₂ 调控。TXA₂ 和 PGI₂ 是评价药物抗血小板作用的黄金指标, 但是 TXA₂ 的生物半衰期只有 30 s, 会迅速转化成更加稳定的 TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} 是 PGI₂ 的水解产物, 常用作标记物来评价 PGI₂ 的生物合成。因此, 本实验通过测定 TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1α} 水平来评价阿司匹林与丹红注射液联用后整体的抗血小板作用。结果显示, 阿司匹林与丹红注射液相互作用并没有拮抗阿司匹林的抗血小板作用, 反而增强了整体的抗血小板作用, 具体的作用机制还需进一步实验探讨。

本研究基于健康动物探讨了阿司匹林与丹红注射液相互作用的药动学一般规律, 初步发现了阿司匹林与丹红注射液联用对阿司匹林水解产物水杨酸药动学的影响, 后期将基于心血管疾病模型进一步评价阿司匹林与丹红注射液的相互作用特征, 以期为阿司匹林与丹红注射液临床联合用药提供充实的实验基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Schmassmann-Suhijar D, Bullingham R, Gasser R, *et al.* Rhabdomyolysis due to interaction of simvastatin with mibefradil [J]. *Lancet*, 1998, 351(9120): 1929-1930.
- [2] Robbins N, Koch S E, Tranter M, *et al.* The history and future of probenecid [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2012, 12(1): 1-9.
- [3] 杜婧, 杨薇, 易丹辉, 等. 基于 HIS “真实世界” 的丹红注射液治疗冠心病患者合并用药分析 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(20): 2821-2824.
- [4] Li J P, Guo J M, Shang E X, *et al.* A metabolomics strategy to explore urinary biomarkers and metabolic pathways for assessment of interaction between Danhong injection and low-dose aspirin during their synergistic treatment [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1026: 168-175.
- [5] Li J P, Guo J M, Hua Y Q, *et al.* The mixture of *Salvia miltiorrhiza-Carthamus tinctorius* (Danhong injection) alleviates low-dose aspirin induced gastric mucosal damage in rats [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(6): 662-671.
- [6] Li J P, Lu J B, Peng Y, *et al.* Characteristic and mechanism of drug-herb interaction between acetylsalicylic acid and Danhong injection mediated by organic anion transporters [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 577012.
- [7] 陈倩, 易丹辉, 谢雁鸣, 等. 基于 HIS “真实世界” 的丹红注射液上市后临床应用分析 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(20): 2817-2820.
- [8] Diehl K H, Hull R, Morton D, *et al.* A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes [J]. *J Appl Toxicol*, 2001, 21(1): 15-23.
- [9] Li J P, Guo J M, Shang E X, *et al.* Quantitative determination of five metabolites of aspirin by UHPLC-MS/MS coupled with enzymatic reaction and its application to evaluate the effects of aspirin dosage on the metabolic profile [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 138: 109-117.
- [10] Miners J O. Drug interactions involving aspirin (acetylsalicylic acid) and salicylic acid [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1989, 17(5): 327-344.
- [11] Helgason C M, Bolin K M, Hoff J A, *et al.* Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke [J]. *Stroke*, 1994, 25(12): 2331-2336.
- [12] Peterson D A, Gerrard J M, Rao G H, *et al.* Salicylic acid inhibition of the irreversible effect of acetylsalicylic acid on prostaglandin synthetase may be due to competition for the enzyme cationic binding site [J]. *Prostaglandins Med*, 1981, 6(2): 161-164.
- [13] Rotilio D, Joseph D, Hatmi M, *et al.* Structural requirements for preventing the aspirin- and the arachidonate-induced inactivation of platelet cyclo-oxygenase: Additional evidence for distinct enzymatic sites [J]. *Eur J Pharmacol*, 1984, 97(3/4): 197-208.
- [14] Loll P J, Picot D, Garavito R M. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H₂ synthase [J]. *Nat Struct Biol*, 1995, 2(8): 637-643.
- [15] Merino J, Livio M, Rajtar G, *et al.* Salicylate reverses *in vitro* aspirin inhibition of rat platelet and vascular prostaglandin generation [J]. *Biochem Pharmacol*, 1980, 29(8): 1093-1096.
- [16] González-Correa J A, Muñoz-Marín J, López-Villodres J

- A, *et al.* Differences in the influence of the interaction between acetylsalicylic acid and salicylic acid on platelet function in whole blood and isolated platelets: Influence of neutrophils [J]. *Pharmacol Res*, 2007, 56(2): 168-174.
- [17] Gladding P A, Webster M W, Farrell H B, *et al.* The antiplatelet effect of six non-steroidal anti-inflammatory drugs and their pharmacodynamic interaction with aspirin in healthy volunteers [J]. *Am J Cardiol*, 2008, 101(7): 1060-1063.
- [18] Kearney P M, Baigent C, Godwin J, *et al.* Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials [J]. *BMJ*, 2006, 332(7553): 1302-1308.
- [19] Clark D W, Layton D, Shakir S A. Do some inhibitors of COX-2 increase the risk of thromboembolic events?: Linking pharmacology with pharmacoepidemiology [J]. *Drug Saf*, 2004, 27(7): 427-456.

[责任编辑 潘明佳]