

丹红注射液中丹参素和原儿茶醛 在大鼠体内的药代动力学研究

唐进法, 宋云香, 鲁静, 孟祥乐, 李学林*

(河南中医学院第一附属医院药学部, 郑州 450000)

[摘要] 目的: 研究大鼠单剂量静脉注射丹红注射液后丹参素和原儿茶醛的药代动力学。方法: 大鼠实施颈静脉插管手术后, 单次尾静脉注射丹红注射液($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 含丹参素 $1.4729 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 原儿茶醛 $0.2290 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 用建立的超高效液相色谱法测定大鼠血浆中丹参素和原儿茶醛的浓度, 并计算药代动力学参数。结果: 丹参素和原儿茶醛的主要药动学参数如下: 最大浓度(C_{\max})分别为(73.73 ± 11.46), (4.60 ± 3.39) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 消除半衰期($t_{1/2}$)分别为(0.88 ± 0.20), (1.13 ± 0.61) h, 血药浓度-时间曲线下面积(AUC_{0-1})分别为(30.19 ± 5.12), (2.15 ± 1.56) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$ 。结论: 丹参素和原儿茶醛在大鼠体内的动力学过程符合二室模型。

[关键词] 丹红注射液; 丹参素; 原儿茶醛; 药代动力学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0118-04

[doi] 10.11653/syfy2014060118

Study on Pharmacokinetics of Danshensu and Protocatechuic Aldehyde in Danhong Injection in Rats

TANG Jin-fa, SONG Yun-xiang, LU Jing, MENG Xiang-le, LI Xue-lin*
(Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Henan College
of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the pharmacokinetics of danshensu and protocatechuic aldehyde in rats after iv administration of Danhong injection. **Method:** After iv administration of Danhong injection to rats at a dose of $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ (containing $1.4729 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ danshensu and $0.2290 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ protocatechuic aldehyde), plasma concentrations of danshensu and protocatechuic aldehyde were determined using developed UPLC method and the main pharmacokinetic parameters were calculated. **Result:** The main pharmacokinetic parameters were as follows: maximum concentration (C_{\max}) were (73.73 ± 11.46), (4.60 ± 3.39) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; half-time ($t_{1/2}$) were (0.88 ± 0.20), (1.13 ± 0.61) h; area under concentration-time curve (AUC_{0-1}) were (30.19 ± 5.12), (2.15 ± 1.56) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$. **Conclusion:** The pharmacokinetic processes of danshensu and protocatechuic aldehyde were fitted to two-compartment models.

[Key words] Danhong injection; danshensu; protocatechuic aldehyde; pharmacokinetics

[收稿日期] 20131003(003)

[基金项目] 河南省科技攻关项目(102102310077)

[第一作者] 唐进法, 中药学硕士, 副主任药师, 从事中药药理学研究, Tel: 0371-66233562, E-mail: a0519@163.com

[通讯作者] *李学林, 中药学硕士, 主任药师, 从事中药合理用药研究, Tel: 0371-66245142, E-mail: lixuelin450000@163.com

丹红注射液是由丹参、红花组成的中药复方制剂, 具有活血化瘀, 通脉舒络的功效, 可用于瘀血闭阻所致的冠心病、心绞痛、心肌梗死等心血管系统疾病, 以及缺血性脑病、脑梗死等脑血管系统疾病^[1-2]。丹参素和原儿茶醛是丹参的主要酚酸类成分, 具有保护缺血心肌、改善缺血再灌注损伤、抗炎、修复神经组织、抗肝纤维化等作用^[3-6]。目前关于丹红注射液酚酸类成分体内过程的研究较少^[7-9],

尚未见丹红注射液中丹参素、原儿茶醛药动学研究的报道。本文应用超高效液相色谱(UPLC)法测定丹红注射液中丹参素、原儿茶醛在大鼠体内的药代动力学特征,为临床合理用药提供依据。

1 材料

1.1 药物 丹红注射液(规格 10 mL,含丹参素 $1.4729 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,原儿茶醛 $0.2290 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,批号 12031018,由菏泽步长制药有限公司生产);丹参素对照品和原儿茶醛对照品购自中国药品生物制品检定所,含量大于 98.0%。

1.2 动物 Wistar 大鼠,SPF 级,体重 240~260 g,雌雄各半,山东鲁抗动物中心提供。动物生产许可证号 SCXK(鲁)20080002。

1.3 试剂 甲醇、冰醋酸均为色谱纯(迪马公司),水为超纯水,其他试剂为分析纯。

1.4 仪器 Waters H-CLASS 超高效液相色谱仪,配备四元泵,自动进样器和紫外检测器(美国 Waters 公司)。

2 方法

2.1 色谱条件 Acquity UPLC BEH ShieLd PR₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), BEH ShieLd PR₁₈ 保护柱(2.1 mm × 5 mm, 1.7 μm),流动相甲醇-0.5% 冰醋酸水溶液(11:89),流速 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 279 nm,柱温 30 °C,进样量 5 μL。

2.2 给药方法和样品采集 Wistar 大鼠 6 只,雌雄各半,实施颈静脉插管手术,插管后饲养 3 d,禁食 12 h,自由饮水。

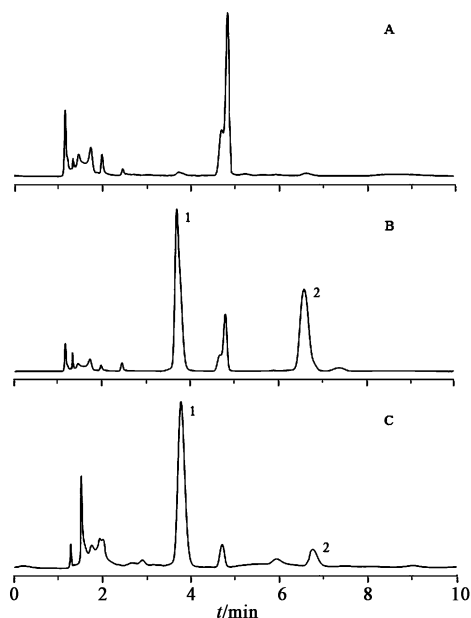
大鼠以 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量尾静脉注射丹红注射液,分别于给药前及给药后 0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4 h 经导管取血约 0.5 mL,置肝素化 EP 管中,在 4 °C 下 $4500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,分离血浆,于 -80 °C 冰箱中保存待测。

2.3 血浆样品处理 取血浆 200 μL,加入 50% 甲醇 200 μL,10% 三氯乙酸溶液 40 μL,涡旋使其充分混合,再加入乙酸乙酯 600 μL,涡旋 1 min,15 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,吸取上清液。剩余物再次加入乙酸乙酯 600 μL 重复之前操作,两次萃取液合并后于 20 °C 氮气流下吹干。残留物用 50% 甲醇 100 μL 溶解,涡旋 1 min,15 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,吸取上清液 5 μL 测定。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 分别将空白血浆、空白血浆加对照品、大鼠给药后血浆样品按“血浆样品处理”操作、测定,色谱图见图 1。丹参素和原儿茶醛的保留

时间分别为 3.7, 6.6 min。结果表明,血浆中丹参素和原儿茶醛的峰形良好,血浆中的内源性物质不干扰样品的测定。



1. 丹参素; 2. 原儿茶醛

图 1 空白血浆(A)、空白血浆加入对照品溶液(B)、大鼠给药后血浆(C)的色谱

2.4.2 标准曲线与最低下限 取空白血浆,加入一定量的丹参素、原儿茶醛混合对照品溶液,配制相当于丹参素血浆质量浓度为 0.087 8, 0.175 6, 0.439 0, 1.756, 4.390, 17.56, 43.90, 87.80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,原儿茶醛血浆质量浓度为 0.031 4, 0.062 8, 0.157 0, 0.628 0, 1.570, 6.280, 15.70, 31.40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品,按“血浆样品处理”操作。以对照品浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)为横坐标,峰面积为纵坐标,用加权最小二乘法($W = 1/X^2$)计算回归方程和相关系数。得到丹参素的典型标准曲线为 $Y = 17\,980.395X - 195.272$, $r = 0.9922$,原儿茶醛的典型标准曲线为 $Y = 85\,283.900X + 4\,244.921$, $r = 0.9963$ 。结果表明,丹参素、原儿茶醛分别在 0.087 8 ~ 87.80, 0.031 4 ~ 31.40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好,定量下限分别为 0.087 8, 0.031 4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4.3 精密度与回收率 取空白血浆,分别加入丹参素、原儿茶醛混合对照品溶液,制备含丹参素 0.175 6, 4.390, 70.24 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,含原儿茶醛 0.062 8, 1.570, 25.12 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血浆质控样品,按“血浆样品处理”操作,于 1 日内处理每个浓度的质控样品 6 份,分别进样测定,计算日内精密度的相对标准偏差(RSD)和准确度,连续测定 3 d,计算日间 RSD 和准

确度,见表 1。

取空白血浆,分别加入丹参素、原儿茶醛混合对照品溶液,制备含丹参素 0.175 6, 4.390, 70.24 mg·L⁻¹, 含原儿茶醛 0.062 8, 1.570, 25.12 mg·L⁻¹ 的血浆质控样品,每个浓度 6 样本,按“血浆样品处理”操作,进样测定,记录峰面积,另取丹参素、原儿茶醛混合对照品溶液,直接注入液相色谱仪,记录峰面积,将质控样品的色谱峰面积与对照品溶液的色谱峰面积进

行比较,计算方法的提取回收率,见表 1。

2.4.4 稳定性试验 取空白血浆,制备含丹参素 0.175 6, 70.24 mg·L⁻¹, 含原儿茶醛 0.062 8, 25.12 mg·L⁻¹ 的血浆质控样品,每个浓度 3 样本,分别在室温下放置 4 h、经历 3 次冷冻-解冻循环、于 -80 ℃ 冷冻放置 15 d,然后按“血浆样品处理”操作,分别进样分析,见表 2。结果表明,样品在上述条件下均稳定。

表 1 大鼠血浆中丹参素和原儿茶醛的精密度和回收率 (n=6)

参数	丹参素/mg·L ⁻¹			原儿茶醛/mg·L ⁻¹		
	0.175 6	4.390	70.24	0.062 8	1.570	25.12
测定值/mg·L ⁻¹	0.167 1 ± 0.017 7	4.202 ± 0.269	66.91 ± 4.91	0.062 1 ± 0.005 0	1.472 ± 0.112	26.80 ± 1.11
准确度/%	95.2	95.7	95.3	98.9	93.8	106.7
日内 RSD/%	10.6	6.6	6.7	8.1	7.5	4.3
日间 RSD/%	8.4	5.1	5.7	10.5	6.5	4.3
回收率/%	92.0 ± 4.6	86.8 ± 4.0	92.1 ± 3.1	96.1 ± 7.5	95.1 ± 5.3	93.0 ± 3.3

表 2 丹参素和原儿茶醛在大鼠血浆中的稳定性 (n=6)

参数	丹参素/mg·L ⁻¹					
	室温稳定性		冻融稳定性		长期稳定性	
	0.175 6	70.24	0.175 6	70.24	0.175 6	70.24
测定值/mg·L ⁻¹	0.153 2 ± 0.010 3	64.95 ± 3.18	0.152 9 ± 0.011 2	65.53 ± 3.47	0.162 1 ± 0.012 7	66.41 ± 4.28
RSD/%	6.74	4.90	7.35	5.29	7.83	6.44

参数	原儿茶醛/mg·L ⁻¹					
	室温稳定性		冻融稳定性		长期稳定性	
	0.062 8	25.12	0.062 8	25.12	0.062 8	25.12
测定值/mg·L ⁻¹	0.058 5 ± 0.003 9	23.68 ± 1.01	0.057 8 ± 0.003 5	23.55 ± 1.07	0.061 1 ± 0.004 9	23.98 ± 2.13
RSD/%	6.71	4.25	6.11	4.56	8.02	8.88

2.4.5 统计学处理 用 DAS2.1.1 软件计算主要的药代动力学参数。最大浓度 (C_{max}) 为实测值,血药浓度-时间曲线下面积 (AUC_{0-t}) 用梯形法计算,以消除相末端血药浓度对数值对时间进行回归,求算消除半衰期 (t_{1/2})。

3 结果

3.1 血药浓度-时间曲线 6 只大鼠单剂量尾静脉注射丹红注射液 (10 mL·kg⁻¹, 含丹参素 1.472 9 g·L⁻¹, 原儿茶醛 0.229 0 g·L⁻¹), 血浆中丹参素、原儿茶醛的平均浓度-时间曲线,见图 2。

3.2 药代动力学参数 大鼠单剂量尾静脉注射丹红注射液后,丹参素、原儿茶醛的药代动力学参数见表 3。

4 讨论

在样品处理过程中,降低溶液 pH 值,可以使水

溶性成分丹参素、原儿茶醛处于游离状态,有利于提

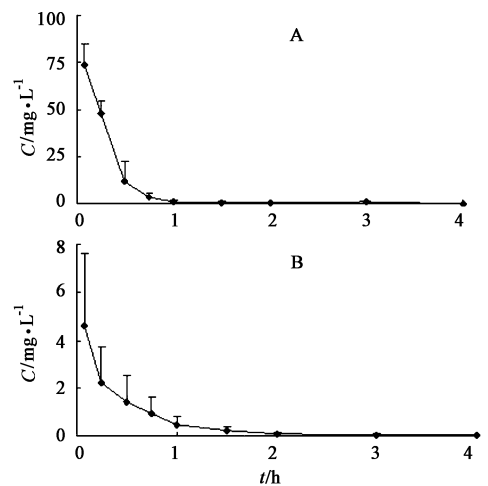


图 2 大鼠单剂量静脉注射丹红注射液后血浆中丹参素 (A)、原儿茶醛 (B) 平均浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

取完全^[5],故本实验决定将血浆样品酸化后再进行萃取。考察了不同酸化剂(10%三氯乙酸溶液,1%醋酸溶液+10%三氯乙酸溶液、1%醋酸溶液+1 mol·L⁻¹盐酸溶液)对提取回收率的影响,结果表明,以10%三氯乙酸溶液为酸化剂,用乙酸乙酯萃取,提取回收率高,内源性物质及杂质较少,故确定10%三氯乙酸溶液为酸化剂。

表3 大鼠单剂量静脉注射丹红注射液后血浆中丹参素和原儿茶醛药代动力学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数及单位	丹参素	原儿茶醛
AUC ₀₋₁ /mg·L ⁻¹ ·h	30.19 ± 5.12	2.15 ± 1.56
AUC _{0-∞} /mg·L ⁻¹ ·h	30.33 ± 5.07	2.18 ± 1.56
t _{1/2} /h	0.88 ± 0.20	1.13 ± 0.61
V _z /L·kg ⁻¹	0.65 ± 0.27	20.91 ± 18.37
C _{max} /mg·L ⁻¹	73.73 ± 11.46	4.60 ± 3.39
CL _z /L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	0.50 ± 0.09	11.77 ± 4.73

本实验所得丹参素的消除半衰期 t_{1/2} 为(0.88 ± 0.20) h,与文献报道不太一致^[10-11],推测是丹红注射液中其他成分影响了丹参素在大鼠体内的吸收过程。丹参素和原儿茶醛在大鼠体内的动力学过程符合二室模型,与文献报道一致^[10,12]。原儿茶醛的表观分布容积远远大于丹参素,可能是由于原儿茶醛结构中含有醛基,脂溶性相对较大,而丹参素极性较强,主要分布在血液中。

中药发挥药效是多种成分综合作用的结果,单一组分的作用不能反映中药整体观的内涵,通过测定多组成分在体内的变化过程而研究中药的药代动力学,能够更好的指导中药制剂的开发及临床应用。

[参考文献]

[1] 曹向阳,许建辉,曹彪.丹红注射液临床应用研究进

展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2010,8(3):340.

[2] 智晓文,苏显明,封卫毅,等.丹红注射液对大鼠离体肠系膜动脉血管环作用及机制[J].中国中药杂志,2012,37(17):2607.

[3] 李美娇,郭虹,刘青青,等.丹红注射液对脑缺血缺氧损伤保护作用的研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(17):206.

[4] 唐进法,徐涛,孟菲,等.合并用药对丹红注射液安全性的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(13):294.

[5] 赵艳威,杨宣,董璨瑾,等.丹参素及原儿茶醛研究进展[J].武警医学院学报,2009,18(3):260.

[6] 舒菁菁,李菲,董耀芬,等.丹参素药理作用及机制的研究进展[J].药学实践杂志,2012,30(4):266.

[7] 王小平,刘峰,杨东华,等.HPLC测定丹红注射液中迷迭香酸在大鼠血浆中的浓度[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):112.

[8] 王小平,刘峰,杨东华,等.HPLC-MS法测定大鼠注射丹红注射液后血浆中3种酚酸类成分[J].中草药,2012,43(2):275.

[9] 刘培宗,贺龙刚,周丽,等.HPLC法比较不同血液样品中丹参素和原儿茶醛的含量[J].福建中医药,2009,40(2):47.

[10] 王娟,马张庆,汪五三,等.丹参素钠及丹参注射液在大鼠体内的药代动力学比较[J].中国中药杂志,2009,34(22):2943.

[11] 洪馨,宓穗卿,王宁生,等.复方丹参滴丸中丹参素的药物动力学研究[J].中药新药与临床药理,2000,11(5):286.

[12] 宋敏,杭太俊,张正行.丹参提取物有效成分在大鼠体内的药代动力学和相互影响研究[J].药学学报,2007,42(3):294.

[责任编辑 聂淑琴]