

· 药物代谢 ·

## 丹参总酚酸在大鼠血浆中的药动学研究

王小平<sup>1,2\*</sup>, 刘峰<sup>2</sup>, 杨东花<sup>1</sup>, 马存德<sup>2</sup>

(1. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西步长制药有限公司, 陕西 咸阳 712000)

**[摘要]** 目的: 考察丹参总酚酸中主要成分紫草酸、丹酚酸 B 在大鼠体内的药代动力学过程。方法: 采用血药浓度法, HPLC 法测定大鼠 ig(1.0 g·kg<sup>-1</sup>) 丹参总酚酸后不同时间点的血药浓度, DAS3.0 软件计算药动学参数。结果: 紫草酸在 1.0 ~ 20.0 mg·L<sup>-1</sup> 线性关系良好( $R^2 = 0.9931$ ); 回收率在 97.15% ~ 100.21%, 日内、日间 RSD < 10.23%; 丹酚酸 B 在 2.0 ~ 20.0 mg·L<sup>-1</sup> 线性关系良好( $R^2 = 0.9925$ ); 回收率在 94.80% ~ 99.96%, 日内、日间 RSD < 10.06%。紫草酸的  $t_{1/2}$  为 19.4 min,  $C_{max}$  为 14.9 mg·L<sup>-1</sup>, AUC 为 418.0 μg·L<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>。丹酚酸 B 的  $t_{1/2}$  为 27.2 min,  $C_{max}$  为 17.1 mg·L<sup>-1</sup>, AUC 为 831.3 μg·L<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>。结论: HPLC 选择性好, 灵敏度高, 适用于血浆样品成分含量的测定, 为进一步的复方药代动力学的研究奠定了基础。

**[关键词]** 丹参总酚酸; 紫草酸; 丹酚酸 B; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0141-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013120141

## Pharmacokinetic Study of Total Phenolic Acids of *Salvia miltiorrhiza* in the Rat Plasma

WANG Xiao-ping<sup>1,2\*</sup>, LIU Feng<sup>2</sup>, YANG Dong-hua<sup>1</sup>, MA Cun-de<sup>2</sup>

(1. Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

2. Shaanxi Buchang Pharmaceuyical Co. Ltd, Xianyang 712000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate pharmacokinetics process of the major components of the total phenolic acids of *Salvia miltiorrhiza* in rats. **Method:** Using HPLC to measure plasma concentration at different time after ig total phenolic acids of *S. miltiorrhiza* was determined; DAS 3.0 software was used to calculate pharmacokinetic parameters. **Result:** Lithospermic acid was linear in the range of 1.0-20.0 mg·L<sup>-1</sup>. Absolute recoveries were between 97.15%-100.21%. The RSD of intra-day and inter-day was less than 10.23%. Salvianolic acid B was linear in the range of 2.0-20.0 mg·L<sup>-1</sup>. Absolute recoveries were between 94.80% - 99.96%. The RSD of intra-day and inter-day was less than 10.06%. Pharmacokinetic parameters of lithospermic acid were as follows:  $t_{1/2} = 19.4$  min,  $C_{max} = 14.9$  mg·L<sup>-1</sup>, AUC = 418.0 μg·L<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>. Pharmacokinetic parameters of salvianolic acid B were as follows:  $t_{1/2} = 27.2$  min,  $C_{max} = 17.1$  mg·L<sup>-1</sup>, AUC = 831.3 μg·L<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>. **Conclusion:** HPLC had good selectivity, high sensitivity for the determination of plasma sample. for the pharmacokinetic studies of lithospermic acid and salvianolic acid B in total phenolic acids of *S. miltiorrhiza*

**[Key words]** total phenolic acids of *S. miltiorrhiza*; lithospermic acid; salvianolic acid B; HPLC

丹参为唇形科鼠尾草属丹参的干燥根及根茎, 又名大红袍、红根赤参、血丹参等, 味苦微寒, 是我国常用中药之一。始载于《神农本草经》, 性苦, 微寒。

归心、肝经。具有祛瘀止痛, 活血通经, 清心除烦之功效<sup>[1,4]</sup>。丹参主要含有水溶性的酚酸类成分和脂溶性的丹参酮类成分。其中紫草酸、丹酚酸 B 等酚

**[收稿日期]** 20110706(005)

**[基金项目]** 陕西省中医药管理局项目(ZY07); 咸阳市科学技术局项目[2011K13-01(6)]

**[通讯作者]** \* 王小平, 副教授, 博士, 从事中药药效物质基础及新药研究, Tel: 13992052795, E-mail: wangxiaoping323@126.com

酸类成分具有扩张冠脉、增加冠脉血流量、防止心肌缺血和心肌梗死、改善微循环、保护心脏、治疗皮肤病等作用<sup>[2,4,11]</sup>。在目前的报道中,多为丹酚酸 B 药代动力学考察<sup>[5]</sup>,对于紫草酸的药代动力学未见报道。本实验采用血药浓度法,HPLC 同时测定血浆样品中紫草酸 (lithospermic acid, LA), 丹酚酸 B (salvianolic acid B, SalB) 的含量,研究大鼠口服丹参总酚酸后的药代动力学特征。

### 1 材料

**1.1 仪器** Agilent 1100 型高效液相色谱仪, MVS-1 型涡旋混合器 (北京金北德工贸有限公司), TGL-16G-A 型高速冷冻离心机 (上海安亭科学仪器厂), Discovery DV215CD 型双量程电子分析天平 (瑞士, 0.01, 0.1 mg)。

**1.2 试药** 丹酚酸 B 对照品 (批号 111562-200807)、肉桂酸对照品 (批号 110786-200503) 均由中国药品生物制品检定所提供, 紫草酸对照品 (批号 070304, 纯度 99.5%) 购自上海友思生物技术有限公司, 丹参总酚酸 (自制), 乙腈色谱纯 (美国迪马公司), 其他试剂均为分析纯。雄性 SD 大鼠 (220 ~ 250 g), 由北京大学医学部实验动物部提供。实验动物使用许可证号 SYXK (京) 2002-0002。实验动物合格证号 SCXK (京) 2002-0001。

### 2 方法与结果

**2.1 标准溶液的制备** 对照品溶液的制备: 精密称取紫草酸对照品 5.0 mg, 丹酚酸 B 对照品 10.0 mg, 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀。用甲醇稀释成系列浓度的对照品溶液。

内标 (internal standard, IS) 溶液的制备: 精密称取肉桂酸对照品 4.36 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀。

**2.2 色谱条件**<sup>[9]</sup> Diamonsil (钻石) C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.4% 的磷酸水, 梯度洗脱 (表 1), 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长 288 nm, 进样量 20 μL, 柱温 25 °C。

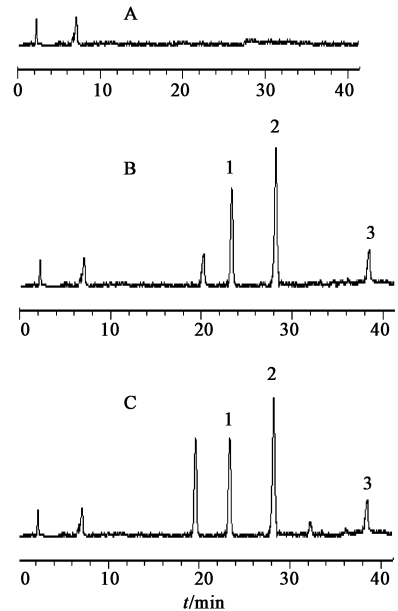
**2.3 血浆样品的预处理** 精密吸取大鼠血浆样品 200 μL, 精密加入内标溶液 50 μL, 涡旋 1 min, 再加入 20% 盐酸溶液 50 μL, 涡旋 2 min, 加入乙酸乙酯 2 mL, 涡旋 2 min。分取上层溶液, 常温下氮气吹干, 残渣精密加入甲醇 100 μL, 涡旋 1 min, 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 即得。

**2.4 专属性考察** 精密取大鼠空白血浆 200 μL、含药血浆 200 μL, 分别精密加入内标溶液 50 μL, 涡旋混匀 1 min, 其余按照“血浆样品预处理”项下方

表 1 流动相梯度洗脱条件

t/min	乙腈/%	0.4% 磷酸水/%
0	5	95
3	12	88
5	15	85
7	20	80
10	23	77
42	30	70

法操作, 进样所得色谱图见图 1。



A. 空白血浆样品; B. 空白血浆 + 对照品 (紫草酸、丹酚酸 B) + 内标 (肉桂酸); C. 静脉注射丹参总酚酸 15 min 的血浆样品 + 内标; 1. 紫草酸; 2. 丹酚酸 B; 3. 肉桂酸

图 1 大鼠血浆中紫草酸、丹酚酸 B 和内标物的 HPLC

**2.5 线性关系及最低定量限** 精密取大鼠空白血浆 200 μL, 分别精密加入系列浓度的对照品溶液 200 μL, 内标溶液 50 μL, 涡旋混匀 1 min, 其余按照 2.3 项下方法操作, 得到系列浓度的血浆标准曲线样品, 每个浓度平行制备 3 份样品。每个样品进样 2 次, 记录各对照品与内标峰面积比, 以峰面积比 Y 为纵坐标, 对照品浓度 (mg · L<sup>-1</sup>) X 为横坐标, 计算回归方程及相关系数 (r)。所得回归方程为 Y<sub>紫草酸</sub> = 0.021 6X + 0.056 5 (r = 0.996 5), 紫草酸血浆浓度在 1 ~ 20 mg · L<sup>-1</sup> 线性关系良好; Y<sub>丹酚酸 B</sub> = 0.023 9X + 0.020 6 (r = 0.996 2), 丹酚酸 B 血浆浓度在 2 ~ 20 mg · L<sup>-1</sup> 线性关系良好。

**最低定量限试验:** 在空白血浆中精密加入一定量的各对照品溶液适量, 混匀, 逐步稀释, 以对照品峰信号与噪音信号比例 10:1 为最低定量浓度, 重复

测定 3 次。紫草酸、丹酚酸 B 最低定量限分别为 1.0, 2.0 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.6 稳定性试验** 精密取大鼠空白血浆 200 μL, 分别精密加入 3 个浓度的对照品溶液 200 μL, 内标溶液 50 μL, 涡旋混匀 1 min, 其余按照 2.3 项下方法操作, 得到高、中、低浓度的血浆质控样品, 每个浓度平行制备 3 份样品。将高、中、低 3 个浓度的血浆样品于常温下保存 12 h, 4 °C 下保存 24 h, 每 4 h 测定 1 次; 在冻融-冷冻循环实验中, 将质控样品置于 -70 °C 下 24 h, 取出后于室温下自然融解后, 再置于 -60 °C 下 24 h, 如此冻融-冷冻循环至少 2 次后测定; 长期稳定性实验中, 将质控样品于 -60 °C 保存 15 d 后进行测定。其 RSD 均 < 10%。说明样品可以在常温下保存 12 h, 4 °C 下保存 24 h, -60 °C 保存 15 d, 药物浓度无明显变化, 基本稳定。

**2.7 回收率试验** 按 2.6 项下的方法制备高、中、低浓度的血浆质控样品, 照 2.2 项下色谱条件分析, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 与未经处理的相应浓度的标准溶液的峰面积比较, 计算提取回收率。同法测定并计算内标提取回收率, 其 RSD 均 < 10%。

表 2 3 种成分加样回收率试验

成份	加入量/mg·L <sup>-1</sup>	回收率/%	RSD/%
LA	1.00	100.21	8.26
	5.00	97.15	3.08
	10.00	99.21	3.69
Sal B	2.00	94.30	6.31
	10.00	99.70	5.03
	20.00	99.96	3.32
IS	43.60	93.12	9.40

**2.8 精密度试验** 按 2.6 项下的方法制备高、中、低浓度的血浆质控样品。按照 2.2 项下色谱条件分析, 每个浓度连续进样 6 次, 测定日内精密度。重复操作, 连续测定 3 d 并随行标准曲线, 测定日间精密度。RSD 均 < 5%。

**2.9 药动学研究** 雄性 SD 大鼠 6 只, 正常饲养 3 d, 试验前禁食 24 h, 自由饮水。灌胃丹参总酚酸 (1.0 g·kg<sup>-1</sup>)。灌胃后分别于 5, 10, 15, 20, 40, 60, 90 min 取血, 采用眼眶静脉丛取血 0.5 mL, 血样用肝素浸润过的离心管收集。所取血液在冰浴中放置 30 min 后, 10 000 r·min<sup>-1</sup>, 0 °C 离心 10 min, 分离血浆, 按 2.3 项下方法处理, 进样 20 μL, 记录峰面积, 代入标准曲线方程, 计算血浆中 LA, SalB 的含量。采用 DAS3.0 软件计算药动学参数, 见表 3。

表 3 LA, SalB 药动学参数 (n=6)

参数	单位	LA	Sal B
C <sub>max</sub>	mg·L <sup>-1</sup>	14.94	17.05
T <sub>max</sub>	min	25	30
t <sub>1/2z</sub>	min	19.435	27.237
AUC	mg·L <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup>	417.961	831.285
V <sub>z</sub>	L·kg <sup>-1</sup>	187.972	139.834
Cl	L·h <sup>-1</sup>	6.703	3.558
MRT	min	35.186	53.602

### 3 讨论

**3.1 色谱条件的优化** 考察了多种不同的流动相组成<sup>[6-8,10]</sup>, 结果发现, 乙腈-0.4% 磷酸溶液作为流动相, 梯度洗脱能够使待测成分和内标得到理想的分离。

**3.2 内标的选择** 考察了不同的化合物如肉桂酸、甲基肉桂酸、3,4-二羟基苯乙酸等, 结果表明肉桂酸与其他待测成分有很好的分离度, 确定肉桂酸为内标。

**3.3 给药剂量的设定** 根据药效学的实验结果, 丹参总酚酸的起效剂量为 0.5, 1.0, 1.5 g·kg<sup>-1</sup> 2 个剂量组的药效更加显著, 且本试验灌胃剂量为 1.0 g·kg<sup>-1</sup> 时, 紫草酸和丹酚酸 B 在血浆中能够检测到, 故本次试验的灌胃剂量为 1.0 g·kg<sup>-1</sup>。

**3.4 血浆样品处理方法优化** 在预实验中对血浆样品的处理方法进行了优化, 比较了沉淀法、萃取法、固相萃取 (SPE) 法对紫草酸、丹酚酸 B 和内标物的提取效果。结果表明, 采用沉淀蛋白法, 紫草酸、丹酚酸 B 和内标物的提取回收率较低; SPE 法在生物样品的前处理过程中被广泛使用, 但在本实验中, 要达到 75% 以上的回收率需要洗脱剂得体积较大, 耗费时间和费用, 因此没有选择; 采用液-液萃取法考察了不同的萃取试剂, 结果表明将血浆样品酸化后, 以乙酸乙酯作为萃取试剂, 紫草酸、丹酚酸 B 和内标物均具有较高的提取回收率且较少引入杂质, 样品处理快速, 省时省力, 故最终确定液-液萃取法为血浆样品的处理方法。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 70.
- [2] 杜冠华, 张均田. 丹参水溶性有效成分-丹酚酸研究进展[J]. 基础医学与临床, 2000, 20(5): 10.
- [3] 吴倩妮, 田宏亮, 张丽菡, 等. 丹参对大鼠肝再生过程影响的 Meta 分析[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(17): 2630.

# LC-ESI-MS-MS 法同时测定大鼠血浆中甲苯磺丁脲/ 4-羟基甲苯磺丁脲、氯唑沙宗及其药代动力学研究

候丛颂<sup>1,2</sup>, 杨志宏<sup>2\*</sup>, 孙晓波<sup>2\*</sup>

(1. 河北北方学院, 河北 张家口 075000; 2. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193)

**[摘要]** 目的:建立灵敏、快速、稳定的测定大鼠血浆中“Cocktail”探针药物甲苯磺丁脲及其代谢产物 4-羟基甲苯磺丁脲、氯唑沙宗的液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-ESI-MS-MS)方法。方法:100  $\mu\text{L}$  血浆样品加入内标格列齐特及乙酸铵,以乙酸乙酯进行液液萃取,离心取上清挥发复溶,LC-ESI-MS-MS 检测。选用 Agilent Eclipse Plus- $\text{C}_{18}$  色谱柱(2.1 mm  $\times$  50 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ),乙腈和 0.01% 甲酸(1 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  甲酸铵)作为流动相,梯度洗脱,流速 0.3 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ ,进样量 10  $\mu\text{L}$ 。采用电喷雾电离源(ESI),扫描方式为多反应离子监测模式(MRM),甲苯磺丁脲  $m/z$  269.1/170.0;4-羟基甲苯磺丁脲  $m/z$  285.1/186.0;氯唑沙宗  $m/z$  168.1/132.1;格列齐特  $m/z$  322.3/170.2。结果:甲苯磺丁脲、4-羟基甲苯磺丁脲和氯唑沙宗的线性范围分别为 0.98 ~ 4 000,0.25 ~ 125,0.98 ~ 2 000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。提取回收率均 >70%,稳定性 RSD <11% 且无基质效应。结论:该方法快速、灵敏、重复性好,可用于血浆中探针药物甲苯磺丁脲、4-羟基甲苯磺丁脲、氯唑沙宗浓度的测定,有助于深入进行代谢酶 CYP2C9 和 CYP2E1 的研究。

**[关键词]** 鸡尾酒探针法; 甲苯磺丁脲; 氯唑沙宗; 液相色谱-电喷雾串联质谱; 肝代谢酶

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0144-07

**[doi]** 10.11653/syjf2013120144

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130412.0946.007.html>

**[网络出版时间]** 2013-04-12 9:46

## Simultaneous Determination of Tolbutamide and Its Metabolite 4-hydroxytolbutamide, Chlorzoxazone in Rat Plasma by LC-MS-MS and Application to Pharmacokinetic Study

**[收稿日期]** 20130114(026)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81102879,81273654);高等学校博士学科点专项科研基金项目(20101106120049);国家重大新药创制专项(2013ZX09103002-022);国家科技支撑计划课题(2008BAI51B02)

**[第一作者]** 候丛颂,硕士研究生, Tel:18911956286, E-mail:houcongson@126.com

**[通讯作者]** \* 杨志宏,副研究员,从事药物代谢动力学及中药复方配伍机制研究, Tel:010-57833219, E-mail:zhyang@implad.ac.cn;

\* 孙晓波,研究员,从事中药药效物质基础与作用机制研究、创新药物研究, Tel:010-57833013, E-mail:sxbimplad@gmail.com

- [4] 王莉. 丹参、人参标准提取物复方配伍在大鼠体内的药理学研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2010.
- [5] 张文静, 曹琦琛, 曹珂. 丹酚酸 B 的药理学研究进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(7): 608.
- [6] 刘嘉, 李俊松, 狄留庆. 丹 B 及其磷脂复合物在 SD 大鼠的生物利用度研究[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(18): 1408.
- [7] 王欣眉, 蒋慧, 徐小平. HPLC 同时测定乐脉颗粒中的丹酚酸 B 和丹参素钠[J]. 华西药理学杂志, 2008, 23(4): 476.
- [8] 高秀朋, 蒋倩, 王鹏娇. HPLC 测定大红袍妇炎宁胶囊中的丹参酮 II<sub>A</sub> 和丹酚酸 B[J]. 华西药理学杂志, 2008, 23(4): 478.
- [9] 王小平, 刘峰, 杨东华. 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): 220.
- [10] 王秀丽, 赵保胜. 复方丹参注射液中丹酚酸 B 在大鼠体内的 HPLC 测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 16(2): 110.
- [11] 张蕾, 刘剑刚, 史大卓. 丹参红花有效部位配伍对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(6): 37.

[责任编辑 顾雪竹]