

RP-HPLC 法测定大鼠血浆中丹参酮 IIA 浓度及其药代动力学研究

乔晋萍, 侯佩玲, 李亚伟*, 再帕尔·阿不力孜

(中国医学科学院·中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定大鼠血浆中丹参酮 IIA 浓度的方法。方法 血浆样品经液-液萃取后, 用 HPLC 法进行分析。色谱柱为 YMC C₁₈ (5 μm, ID 3.0 mm × 150 mm); 流动相为乙腈-水-冰醋酸 (74: 26: 1); 流速 0.3 mL·min⁻¹; 检测波长 270 nm; 内标为 4-氯联苯。结果 线性范围为 0.05 mg·L⁻¹ ~ 6.40 mg·L⁻¹, 最低检测浓度为 0.05 mg·L⁻¹。高、中、低 3 种浓度的平均方法回收率分别为 98.9%, 102.1% 和 100.4%。日内、日间精密性 (RSD) 均小于 5%。结论 本方法稳定、简便、可靠, 可用于丹参酮 IIA 的血药浓度分析及其药代动力学研究。

关键词: 高效液相色谱法; 丹参酮 IIA; 血药浓度; 药代动力学

中图分类号: R917.101 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2003)05-0368-03

Determination of tanshinone IIA in rat plasma and the pharmacokinetics by RP-HPLC method

QIAO Jin-ping, HOU Pei-ling, LI Ya-wei*, ABLIZ Zeper

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: **Aim** To develop a sensitive and rapid HPLC method for the determination of tanshinone IIA (TS) in rat plasma and to study its pharmacokinetics in rats. **Methods** TS and 4-chlorodiphenyl (internal standard) were extracted from plasma with ethyl acetate. After liquid-liquid extraction, the sample was analyzed by HPLC with YMC C₁₈ column (5 μm, 150 mm × 3.0 mm ID). The mobile phase consisted of acetonitrile-water-acetic acid (74: 26: 1) at the flow rate of 0.3 mL·min⁻¹, the UV detection wave length was 270 nm. **Results** The calibration curve was linear ($r=0.9981$) in the range from 0.05 to 6.40 mg·L⁻¹. The lowest detectable concentration was 0.05 mg·L⁻¹. The recoveries at the concentration of 0.05, 1.60 and 6.40 mg·L⁻¹ were 98.9%, 102.1% and 100.4%, respectively. The inter- and intra-day RSDs were all less than 5%. **Conclusion** This method is proved to be rapid, precise and reliable enough to be applied to the pharmacokinetics studies of TS in rats after a single dose of 15 mg·kg⁻¹ by oral administration.

Key words: HPLC; tanshinone IIA; plasma drug concentration; pharmacokinetics

丹参酮 IIA (tanshinone IIA, TS) 是从唇形科植物丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 的根中提取分离的二萜醌类化合物, 为丹参中的有效成分, 具有多种药理活性, 如抗菌、抗氧化、扩张冠状动脉、增加心肌血流量等^[1]。中国药典 1995 版以 TS 为定量指标用高效液相色谱法进行质量控制^[2], 此外还有用固相萃取

分光光度法^[3]、薄层色谱-荧光法^[4]、高效液相色谱法^[5]和 SFE-CGC 法^[6]测定丹参药材中 TS 的含量。但用 RP-HPLC 法测定 TS 的血药浓度及药代动力学研究至今未见报道。本研究建立了反相高效液相色谱法 (RP-HPLC) 测定大鼠血浆中 TS 的浓度, 并研究了 TS 在大鼠的体内过程及其药代动力学参数, 为临床前研究提供参考。

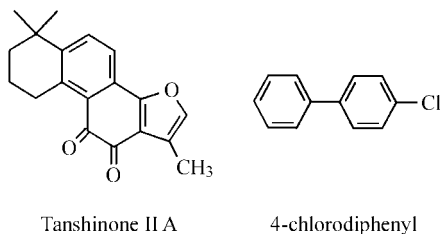
丹参酮 IIA (tanshinone IIA) 和内标 4-氯联苯 (4-chlorodiphenyl) 的结构分别为:

收稿日期: 2002-07-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970861).

* 通讯作者 Tel: 86-10-63165218, Fax: 86-10-63017757,

E-mail: zeper@imm.ac.cn



材料与amp;方法

仪器 日本 Jasco 公司高效液相色谱仪(包括 PU-980 泵, UV-975 检测器); SRI MODEL 203 Peak Simple Chromatography Data System; 高速台式离心机; 旋涡混合器。

药品与试剂 TS 对照品(含量 > 99%) 购于 DELTA 天然有机化合物信息中心; 4-氯联苯(内标, 分析纯), 上海试剂一厂; 乙腈和甲醇均为色谱纯, Merck 公司; 冰醋酸, 乙酸乙酯, 分析纯, 北京化工厂; 水为重蒸水。

试验动物 SD 大鼠, ♂, 体重(210 ± 20) g, 北京维通利华实验动物公司提供。

色谱条件 色谱柱: YMC C₁₈ 柱(5 μm, ID 3.0 mm × 150 mm); 流动相: 乙腈-水-冰醋酸(74: 26: 1), 流速: 0.3 mL·min⁻¹, 检测波长 270 nm。

血浆样品处理 取大鼠血浆 0.2 mL, 加入内标溶液(0.05 g·L⁻¹ 4-氯联苯甲醇溶液) 30 μL, 混匀, 加入乙酸乙酯 3 mL, 涡流震荡 10 min, 离心 10 min (3 000 r·min⁻¹), 分取上层有机相, 于 40 °C 氮气流下吹干, 残留物溶于 200 μL 流动相中, 涡流 1 min, 离心后取上清液 20 μL 进样^[7]。

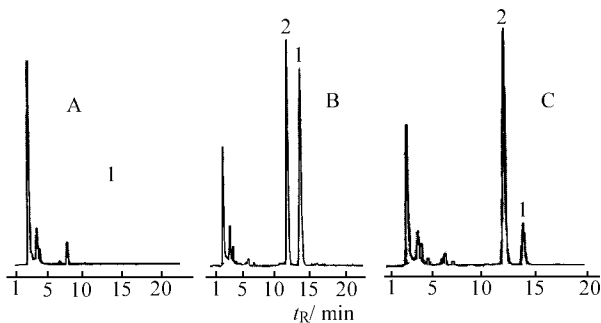
结果

1 色谱行为

在上述色谱条件下, 空白血浆、含药血浆和实测血浆的色谱如图 1 所示, 色谱分离良好, 不受内源性杂质峰干扰, 内标保留时间为 11.68 min, TS 的保留时间为 13.53 min。

2 标准曲线

取大鼠空白血浆 0.2 mL, 加入 TS 系列标准溶液 50 μL, 配制成相当于浓度为 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.60, 3.20 和 6.40 mg·L⁻¹ 的血浆样品, 按照上述方法中“血浆样品处理”项下操作。以血浆中待测物浓度(C)为横坐标, 待测物与内标物的峰面积之比(Y)为纵坐标, 回归方程为 $Y = 0.021\ 64\ C - 0.000\ 771$, $r = 0.998\ 1$, 最低定量浓度为 0.05 mg·L⁻¹ (S/N = 3)。



A: Blank plasma sample; B: Plasma sample spiked with 3.20 mg·L⁻¹ tanshinone IIA (1) and internal standard (2); C: Plasma sample 0.17 h after an oral administration of TS (15 mg·kg⁻¹) to a SD rat; IS: 4-chlorodiphenyl

Figure 1 HPLC Chromatograms of tanshinone IIA (TS) and internal standard (IS)

3 回收率与精密度

用空白血浆配制含 TS 分别为 0.05, 1.60 和 6.40 mg·L⁻¹ 的标准血样, 按“血浆样品处理”项下方法操作, 每一浓度进行 5 样本分析, 平均方法回收率分别为 98.9%, 102.1% 和 100.4%。在 1 d 内不同时间进样, 测得 3 种浓度标准血浆的日内 RSD 分别为 3.2%, 2.4% 和 1.6% (n = 5)。相同浓度的标准血浆在 5 d 内的日间 RSD 分别为 4.7%, 3.6% 和 2.9% (n = 5)。

4 稳定性考察

本文初步考察了 TS 在不同保存条件下的稳定性^[8]。其血浆样品在冷冻-融化循环 3 次实验中, 测定 TS 的浓度无明显降低(相对偏差在 10% 之内); 4 °C 下, TS 在甲醇溶液中至少可保存 3 个月; 室温条件下其在流动相中至少可稳定存在 24 h。

5 TS 在大鼠体内药代动力学研究

SD 大鼠 10 只, 按体重随机分成 2 组, 每组 5 只, 每只大鼠间隔一定的时间取血, 每个取血点有 5 个样本, 即第 1 组动物取血时间点分别为 0.08, 0.25, 0.5, 1.0, 3.0, 6.0, 10.0, 16.0 和 24.0 h; 第 2 组动物取血时间点分别为 0, 0.17, 0.33, 0.67, 2.0, 4.0, 8.0, 12.0 和 20.0 h。给药前禁食 12 h, 全程不禁饮水。用吐温-80 和生理盐水配制一定浓度的 TS 混悬液, ig 15 mg·kg⁻¹, 于不同时间点由眼眶后静脉丛取血约 500 μL, 置于肝素化离心试管中, 离心分离血浆, 按上述方法中“血浆样品处理”项下操作, 测定得大鼠单次 ig TS 的平均血药浓度-时间曲线, 结果见图 2。

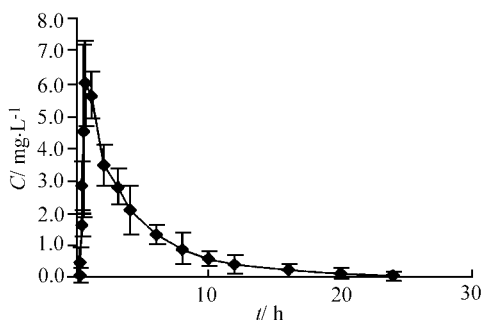


Figure 2 Mean plasma concentration-time curve of tanshinone IIA after single oral dose of 15 mg·kg⁻¹ in rats

用中国药理学学会 3P87 实用药代计算程序处理, 自动进行推算, 模型、权重选择, 拟合的药-时曲线符合 *po* 给药二室模型, 有关药代动力学参数见表 1。

Table 1 Pharmacokinetic parameters of tanshinone IIA after single oral dose of 15 mg·kg⁻¹ in rats

Parameter	Values	Standard error (SE)
A / mg·L ⁻¹	30.82	2.57E+01
B / mg·L ⁻¹	3.87	1.80E+0
α / h ⁻¹	1.27	3.18E-01
β / h ⁻¹	0.19	7.99E-02
T _{1/2α} / h	0.55	
T _{1/2β} / h	3.63	
T _{1/2ka} / h	0.41	
k _a / h ⁻¹	1.69	3.17E-01
T _{max} / h	0.85	
C _{max} / mg·L ⁻¹	5.57	
V _d / mL	1.34	
AUC / mg·h·L ⁻¹	24.09	

讨论

本实验建立了 RP-HPLC 测定丹参酮 IIA 在大鼠体内的血药浓度的方法, 并进行了药代动力学探讨。

为减少操作误差, 加入了内标准物。试验证明, 本方法有内源性杂质不干扰, 出峰时间合适和重现性好等优点, 对于该药的体内代谢研究具有一定的意义。

由药动学参数可知, 大鼠 ig 丹参酮 IIA 后, 吸收相半衰期为 0.55 h, 消除相半衰期为 3.63 h 属于短半衰期药物。有关丹参酮 IIA 的体内代谢情况将进一步研究。

References :

- [1] Handbook of the Composition and Pharmacology of Common Chinese Drugs (常用中药成分与药理手册) [Z]. Beijing: China Medicor Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 1994. 598.
- [2] The State Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 1995. 62 - 63.
- [3] Shun WJ, Meng HB, Gao H. Determination of tanshinone IIA in *Salvia miltiorrhiza* Bunge by solid phase extraction-HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1996, 16(3): 199 - 200.
- [4] Liu WJ, Wang BQ, Li XF. Determination of tanshinone IIA by TLC-fluorescence chromatography [J]. *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 1996, 11(6): 224 - 226.
- [5] Hu SY. Research of determination of tanshinone IIA by ultrasonic extraction-HPLC [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药理学), 1993, 10(4): 18 - 20.
- [6] Chen B, Zhu M, Xing WJ, et al. SFE-CGC Determination of Tanshinone IIA in *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(1): 55 - 57.
- [7] Xue M, Cui Y, Wang HQ, et al. Pharmacokinetics of cryptotanshinone and its metabolite in pigs [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, 34(2): 81 - 84.
- [8] Du Y, Chen XY, Yang HY, et al. Determination of wogonin in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(5): 362 - 366.