



盐酸小檗碱对大鼠口服地高辛药动学的影响

鞠洋¹, 邱雯^{1*}, 蒋学华², 刘昌孝³

(1. 兰州大学第二医院药剂科, 甘肃兰州 730030; 2. 四川大学华西药学院, 四川成都 610041;
3. 天津药物研究院天津药代动力学与药效动力学国家重点实验室, 天津 300193)

[摘要] 目的: 研究盐酸小檗碱(BBR)与地高辛(DIG)合用对大鼠体内DIG药动学的影响。方法: 大鼠随机分为DIG单用组和DIG+BBR低、中、高剂量合用组。大鼠单剂量或多剂量给予BBR后, 放免法测定单次口服DIG的血药浓度。药-时数据经3P97药动学软件处理, 获得各组药动学参数。结果: 合用后, BBR在低剂量时($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)对DIG的药动学过程无显著影响; 但在中、高剂量($30, 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)时有显著影响, AUC_{0-1} 分别增加了33%, 70% (单剂量)和27%, 75% (多剂量) ($P < 0.05$)。结论: 体内研究表明BBR与DIG合用时, 在一定浓度范围内, 可明显提高其生物利用度, 其机制可能与BBR抑制肠道P-糖蛋白有关。

[关键词] 盐酸小檗碱; 地高辛; 药动学; P-糖蛋白

盐酸小檗碱(berberine, BBR)是临床常用的天然药物。有文献报道BBR与多种药物合用时会发生相互作用^[1-5]。体内研究发现, BBR可显著升高肾移植患者血中CYP3A和P-糖蛋白(P-gp)双重底物环孢素的药物浓度^[6], 可能与BBR参与CYP3A或P-gp的表达与活性有关。然而BBR对CYP或P-gp的作用机制尚不明确, 有限的文献报道有较大争议^[7-8]。地高辛(digoxin, DIG)是临床上常用的强心苷类药物, 也是经典的P-gp底物。DIG安全范围狭窄, 治疗量已接近60%的中毒剂量, 其吸收及分泌排泄受P-gp诱导剂及抑制剂的影响^[9]。许多药物与DIG同时服用会产生有临床意义的药动学、药效学相互作用, 引起DIG中毒或治疗失败^[10-12]。目前尚无关于BBR引起DIG药动学改变的体内外研究报告。本实验选择DIG为P-gp的探针药物, 考察BBR对DIG口服给药在大鼠体内药动学的影响。探讨BBR对P-gp的作用及潜在的临床意义。

1 材料

1.1 仪器 伽玛计数器(天津德普生物制品有限公司); KDC-2046型低温离心机(科大科技实业总公司中佳光电仪器分公司); XH-B型旋涡混匀器

(江苏康健医疗用品有限公司); Sartorius ME215S型电子天平(德国赛多利斯股份有限公司); 3P97药动学软件(中国药理学会数学药理专业委员会3P97编制小组)。

1.2 试药 盐酸小檗碱原料药(四川省广汉天府实业有限公司, 批号070105, 纯度98.3%), 地高辛对照品(中国药品生物制品检定所, 批号100015-200308); 地高辛放射免疫分析药盒(北京北方生物技术研究所, 批号080320, 080420); 纯化水(兰州大学第二医院自制)。

1.3 动物 Wistar大鼠, 雄性, 6~8周龄, 体重180~200g, 购于甘肃中医学院实验动物中心, 合格证号SCXK(甘)2004-007。

2 方法

2.1 血清中DIG浓度测定方法 按DIG放射免疫分析药盒标准操作规程测定血清中DIG含量。精密吸取待测血清样品50 μL , ^{125}I -Dig、兔抗-Dig抗体各100 μL , Dig驴抗兔免疫分离剂200 μL 。充分摇匀后37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴温育30 min, 3 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min, 吸弃上清, 于伽玛计数器中测定各沉淀管的放射性计数(cpm)并计算DIG浓度值。

2.2 BBR单剂量给药及采血方法 Wistar大鼠随机分为4组, 每组5只, 即DIG组和DIG+BBR低、中、高剂量组($10, 30, 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。给药前禁食12 h, 自由饮水。实验当日, 以戊巴比妥钠 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射, 麻醉动物。股静脉插管用于补充血容量, 股动脉插管以获取血样, 并

[稿件编号] 20100713012

[通信作者] * 邱雯, 博士, 副主任药师, E-mail: qiuwenmm@sina.com

[作者简介] 鞠洋, 硕士, 副主任药师, E-mail: jy0912@sohu.com



以 $200 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 肝素钠生理盐水溶液封管。待大鼠清醒后, DIG + BBR 组给予不同剂量的 BBR, DIG 组给予相同体积的纯化水。各组大鼠均于 1 h 后灌胃给予 DIG 溶液, 剂量为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (质量浓度为 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 溶剂为含 12% 乙醇的水溶液), 于给药前及给药后 20, 40 min 和 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 20, 24, 30 h 自股动脉采血 0.4 mL (弃去最初含肝素的全血样品, 收集待测的 0.3 mL 全血), 并以股静脉补充相同体积的生理盐水。分离血清, 于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。以放射免疫分析法测定血清样品中 DIG 的含量。

2.3 BBR 多剂量给药及采血方法 Wistar 大鼠随机分为 4 组, 每组 5 只, 即 DIG 组和 DIG + BBR 低、中、高剂量组 ($10, 30, 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。DIG + BBR 组灌胃给予各剂量 BBR, 每日 2 次, 连续给药 13 d。于第 13 天末次给予 BBR 后禁食 12 h, 自由饮水。第 14 天, 以戊巴比妥钠 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射, 麻醉动物, 分离股动脉及股静脉。待大鼠清醒后, 灌胃给予 BBR, DIG 组给予相同体积的纯化水。于 1 h 后灌胃给予 DIG, 剂量为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 其余同 2.2。

2.4 数据处理 DIG 浓度-时间数据经 3P97 药动学软件进行拟合分析。 C_{max} 和 T_{max} 为直接测定值。AUC, K_a , K_e , $t_{1/2}$, CL/F 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 t 检验进行统计学分析。采用非参数

检验进行 t_{max} 比较。检验水平为 0.05。

3 结果

3.1 BBR 单剂量给药对口服 DIG 药动学的影响 单剂量给予 BBR 后, 口服 DIG 的药时曲线见图 1, 药动学参数见表 1。DIG 口服给药体内过程符合一室模型。与 DIG 单用组比较, 合用组各时点浓度均有提高。BBR ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 对 DIG 药动学过程无显著影响。BBR ($30, 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 合用组的 AUC_{0-1} 较单用组分别提高了 33%, 70% ($P < 0.05$); T_{max} 明显延长 ($P < 0.05$); C_{max} 增加; 高剂量组 $t_{1/2}$ 增大, 但差异均无统计学意义。

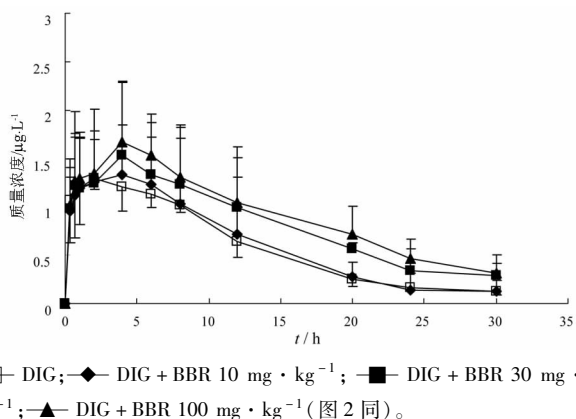


图 1 大鼠合用单剂量 BBR 后口服 DIG 的平均血药浓度-时间曲线

表 1 单剂量 BBR 合用后 DIG 口服给药的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

参数	DIG	DIG + BBR (单用)		
		$10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
$\text{AUC}_{0-1} / \text{ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$	16.39 ± 1.06	18.61 ± 7.45	21.87 ± 10.02	$27.79 \pm 11.14^{1)}$
$\text{AUC}_{0-\infty} / \text{ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$	18.09 ± 1.31	19.91 ± 8.24	24.93 ± 11.50	$32.54 \pm 12.58^{1)}$
$\text{CL}/\text{F}/\text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	2.52 ± 0.51	2.35 ± 0.73	2.23 ± 1.07	1.89 ± 0.78
K_e/h^{-1}	0.08 ± 0.03	0.08 ± 0.04	0.08 ± 0.04	0.07 ± 0.03
$t_{1/2}/\text{h}$	9.22 ± 2.95	9.01 ± 3.89	8.97 ± 4.11	11.64 ± 5.35
K_a/h^{-1}	2.55 ± 1.32	1.84 ± 0.71	1.95 ± 0.80	2.12 ± 1.33
T_{max}/h	1.80 ± 0.45	2.40 ± 0.89	$4.40 \pm 0.89^{1)}$	$4.40 \pm 0.89^{1)}$
$C_{\text{max}}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	1.46 ± 0.19	1.43 ± 0.49	1.61 ± 0.70	1.67 ± 0.78

注: 与 DIG 组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 BBR 多剂量给药对口服 DIG 药动学的影响 多剂量给予 BBR 后, 口服 DIG 的药时曲线见图 2, 药动学参数见表 2。与 DIG 单用组比较, 合用组各时点浓度均有提高。DIG 的 AUC_{0-1} 较单用组分别提高 23%, 27%, 75%

($P < 0.05$)。BBR ($30, 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 合用组的 C_{max} 显著提高, 比单用组分别提高了 32%, 61% ($P < 0.05$)。各剂量合用组 DIG 的吸收速率常数 K_a 显著提高, 但 T_{max} 明显缩短, 差异均具有统计学意义。



表2 多剂量 BBR 合用后 DIG 口服给药的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

参数	DIG	DIG + BBR(2周)		
		10 mg · kg ⁻¹	30 mg · kg ⁻¹	100 mg · kg ⁻¹
AUC ₀₋₁ /ng · h ⁻¹ · mL ⁻¹	15.83 ± 2.12	19.55 ± 6.21	20.11 ± 2.04 ¹⁾	27.73 ± 6.13 ¹⁾
AUC _{0-∞} /ng · h ⁻¹ · mL ⁻¹	19.22 ± 2.68	21.46 ± 8.87	31.42 ± 11.08 ¹⁾	33.89 ± 10.24 ¹⁾
CL/F/L · kg ⁻¹ · h ⁻¹	2.31 ± 0.58	2.21 ± 0.63	2.03 ± 0.52	1.87 ± 0.49
K _e /h ⁻¹	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02
t _{1/2} /h	9.07 ± 2.34	9.52 ± 3.16	11.80 ± 6.81	11.17 ± 5.37
K _a /h ⁻¹	2.94 ± 1.05	4.75 ± 1.83 ¹⁾	12.79 ± 8.46 ²⁾	19.69 ± 7.49 ²⁾
T _{max} /h	1.60 ± 0.55	0.87 ± 0.18 ¹⁾	0.53 ± 0.18 ²⁾	0.53 ± 0.18 ²⁾
C _{max} /μg · L ⁻¹	1.52 ± 0.24	1.54 ± 0.62	2.01 ± 0.37 ¹⁾	2.45 ± 0.56 ¹⁾

注:与 DIG 组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01。

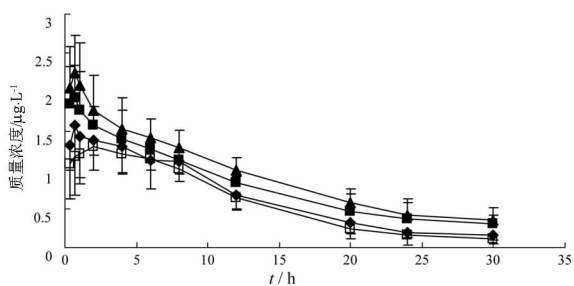


图2 大鼠合用多剂量 BBR 后口服 DIG 的平均血药浓度-时间曲线

4 讨论

地高辛是经典的 P-gp 底物,其处置与 P-gp 活性紧密联系,是体内、体外研究药物相互作用时常用的工具底物^[13-14]。P-gp 多表达于大脑、肝脏、肾脏及小肠,具有药物外排转运功能^[15]。P-gp 主要参与口服地高辛的小肠吸收及肾脏消除^[16]。

天然有机化合物两性离子(如黄连生物碱)是天然的多药耐药的底物。BBR 与 P-gp 底物之间可能存在竞争性抑制作用。在现有文献中,对 BBR 诱导还是抑制 P-gp 功能的评价相互矛盾:Lin 等^[7]报道了 BBR 可上调人和小鼠肝癌细胞中多药耐药转运体的表达和功能,还可对抗非小细胞肺癌中由 MDRI 表达所介导的肿瘤细胞中经典的 P-gp 底物紫杉醇的功能^[17];然而,另一项研究显示 BBR 可提高在培养的牛脑毛细血管内皮细胞中罗丹明 123 的累积量^[8]。

本实验结果显示,合用 BBR 后,无论单剂量或多剂量,均可不同程度的提高口服 DIG 的生物利用度。BBR(30, 100 mg · kg⁻¹) 组中, AUC₀₋₁ 分别是 DIG 组的 1.33, 1.70 (单剂量) 倍和 1.27, 1.75 倍(多剂量)。在多剂量组中,随 BBR 剂量的增加, K_a

显著提高, K_e 无明显变化。提示 BBR 对大鼠小肠 P-gp 的抑制作用可能是引起 BBR-DIG 相互作用的主要原因,并且随 BBR 剂量的增加,其对小肠 P-gp 抑制作用呈增强趋势。

本实验结果具有潜在的临床意义。由于 BBR 使用广泛,患者自行服药现象相当普遍。当 BBR 与 P-gp 底物如免疫抑制剂(CsA、他克莫司)、抗癌药(阿糖胞苷、长春新碱)、抗心律失常药(DIG, 维拉帕米)合用时,可使 P-gp 底物生物利用度增加,可能最终导致其功效和/或毒性的增加。

利用体内药动学模型,本实验观察到在一定浓度范围内, BBR 对大鼠口服 DIG 体内药动学参数有显著影响。BBR 对 P-gp 表达及 BBR 对其他 P-gp 底物的药动学影响需要更进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Taylor C T, Baird A W. Berberine inhibition of electrogenic transport in rat colon[J]. Br J Pharmacol, 1995, 116(6):2667.
- [2] Kaneda Y, Torii M, Tanaka T, et al. *In vitro* effects of berberine sulphate on the growth and structure of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* [J]. Ann Trop Med Parasit, 1991, 85(4):417.
- [3] Iizuka N, Miyamoto K, Okita K, et al. Inhibitory effect of Coptidis Rhizoma and berberine on the proliferation of human esophageal cancer cell lines [J]. Cancer Lett, 2000, 148(1):19.
- [4] Ckless K, Schlottfeldt J L, Pasqual M, et al. Inhibition of *in vitro* lymphocyte transformation by the isoquinoline alkaloid berberine [J]. J Pharm Pharmacol, 1995, 47(12A): 1029.
- [5] Sánchez-Chapula J. Increase in action potential duration and inhibition of the delayed rectifier outward current I_K by berberine in cat ventricular myocytes [J]. Br J Pharmacol, 1996, 117(7): 1427.
- [6] Wu X, Li Q, Xin H, et al. Effects of berberine on the blood concentration of cyclosporine A in renal transplanted recipients: clinical and pharmacokinetics study [J]. Eur J Clin Pharmacol,



- 2005, 61(8):567.
- [7] Lin H L, Liu T Y, Lui W Y, et al. Up-regulation of multidrug resistance transporter expression by berberine in human and murine hepatoma cells[J]. *Cancer*, 1999, 85(9): 1937.
- [8] He L, Liu G Q. Effects of various principles from Chinese herbal medicine on rhodamine123 accumulation in brain capillary endothelial cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(7):591.
- [9] Kurzawski M, Bartnicka L, Florczak M, et al. Impact of ABCB1 (MDR1) gene polymorphism and P-glycoprotein inhibitors on digoxin serum concentration in congestive heart failure patients[J]. *Pharmacol Rep*, 2007, 59(1):107.
- [10] Gurley B J, Swain A, Barone G W, et al. Effect of goldenseal (*Hydrastis canadensis*) and kava kava (*Piper methysticum*) supplementation on digoxin pharmacokinetics in humans[J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35(2):240.
- [11] Ghanem C I, Gómez P C, Arana M C, et al. Induction of rat intestinal P-glycoprotein by spironolactone and its effect on absorption of orally administered digoxin[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318(3):1146.
- [12] Becquemont L, Glaeser H, Drescher S, et al. Effects of ursodeoxycholic acid on P-glycoprotein and cytochrome P450 3A4-dependent pharmacokinetics in humans[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2006, 79(5):449.
- [13] Peng S X, Ritchie D M, Cousineau M, et al. Altered oral bioavailability and pharmacokinetics of P-glycoprotein substrates by coadministration of biochanin A[J]. *Pharm Sci*, 2006, 95(9):1984.
- [14] Yoshida N, Takagi A, Kitazawa H, et al. Effects of citronellal, a monoterpenoid in *Zanthoxyl Fructus*, on the intestinal absorption of digoxin in vitro and vivo[J]. *Pharm Sci*, 2006, 95(3):552.
- [15] Matheny C J, Lamb M W, Brouwer K R, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation[J]. *Pharmacotherapy*, 2001, 21(7):778.
- [16] Hori R, Okamura N, Aiba T, et al. Role of P-glycoprotein in renal tubular secretion of digoxin in the isolated perfused rat kidney[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993, 266(3):1620.
- [17] Lin H L, Liu T Y, Wu C W, et al. Berberine modulates expression of *mdr1* gene product and the responses of digestive track cancer cells to Paclitaxel[J]. *Br J Cancer*, 1999, 81(3):416.

Effect of berberine on pharmacokinetics of digoxin after oral administration to rats

JU Yang¹, QIU Wen^{1*}, JIANG Xuehua², LIU Changxiao³

(1. Department of Pharmacy, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, China;

2. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

3. State Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of berberine (BBR) on the pharmacokinetics of digoxin (DIG) in rats. **Method:** Rats were randomly assigned into DIG, low dose-BBR, middle dose-BBR and high dose-BBR group. After single or a 2-week *ig* pretreatment with BBR, serum DIG concentration was determined by radioimmunoassay. Pharmacokinetic calculations were performed on each individual set of data using 3P97 practical pharmacokinetic software. **Result:** No significant difference was found between the control and 10 mg · kg⁻¹ BBR combined group. After pretreatment with BBR (30, 100 mg · kg⁻¹), the pharmacokinetic parameters of *ig* DIG were significantly altered. The AUC₀₋₁ of DIG with BBR increased by 33% and 70% (single), 27% and 75% (2-week), respectively. **Conclusion:** BBR increases bioavailability of DIG, which may be related to its inhibition effect on intestinal P-gp.

[Key words] berberine; digoxin; pharmacokinetics; P-gp

doi:10.4268/cjmm20110721

[责任编辑 张宁宁]



香丹注射液中3种酚酸类成分在大鼠体内的药动学研究

高志娟¹, 桑柏¹, 梁杨静¹, 王世祥¹, 于洁¹, 郑晓晖^{1,2,*}

(1. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069;

2. 西北大学与深圳清华大学研究院共建实验室, 广东 深圳 518057)

[摘要] 目的:建立香丹注射液中丹参素(DSS)、原儿茶酸(PA)、原儿茶醛(PAL)在大鼠血浆中的HPLC分析方法,以间羟基苯甲酸为内标,研究香丹注射液中3种酚酸类成分在大鼠体内的药动学过程。方法:10%三氯乙酸沉淀蛋白,乙酸乙酯萃取,HPLC法测定不同时间点血浆中DSS,PA,PAL血药浓度,DAS2.0数据处理软件对数据进行统计学处理。结果:DSS在0.68~44.0 mg·L⁻¹,PA在0.43~14.0 mg·L⁻¹,PAL在0.38~12.0 mg·L⁻¹具有良好的线性关系,平均回收率均大于92%,精密度和稳定性试验RSD 0.4%~4.8%;香丹注射液中丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛均呈二室开放模型,其主要药动学参数分别为 $t_{1/2\alpha}$ (6.26±4.6), (5.93±4.9), (18.44±2.4) min; $t_{1/2\beta}$ (64.11±8.8), (63.28±0.13), (69.315±0) min; AUC_{0-∞} (852.98±175.6), (83.84±58.8), (147.79±12.3) mg·min⁻¹·L⁻¹。结论:建立了香丹注射液中DSS,PA,PAL血药浓度的测定方法,该方法准确,灵敏,稳定性好,回收率高,且适用于其药动学的研究。

[关键词] 香丹注射液;丹参素;原儿茶酸;原儿茶醛;药动学

香丹注射液是由降香与丹参提取物配制而成,具有扩张血管、增进冠状动脉血流量等作用,临床上用于治疗脑出血、肺心病、脑梗塞等疾病^[1-2]。丹参素、原儿茶酸的药动学研究已有文献报道^[3-4],但未见香丹注射液中丹参素(DSS)、原儿茶酸(PA)、原儿茶醛(PAL)的药动学研究。本文采用RP-HPLC,对蛋白沉淀剂、血浆样品萃取条件进行优化,建立了DSS,PA,PAL在大鼠体内的RP-HPLC分析法,并研究了静脉注射给药后DSS,PA,PAL的药动学过程,以期为临床用药提供参考。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);TGL-16G高速离心机(上海安宁科学仪器公司);BP221S型1/10万电子天平(德国赛多利斯公司);BF2000氮气吹干仪(北京八方世纪科技有限公司);SK-1型快速混匀器。

1.2 试剂与药品 香丹注射液(山西亚宝药业集团有限公司,批号Z14020768);丹参素、原儿茶酸、

原儿茶醛对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为110855-200506,110809-200503,110810-200205);肝素钠注射液(河北常山生化药业有限公司,批号050800);色谱级甲醇(美国Fisher公司);其他试剂均为分析纯。

1.3 动物 SD大鼠,由西安交通大学实验动物中心提供,合格证号陕医动证字2006105,雌雄兼用,体重220~250 g。

2 方法

2.1 血浆样品处理 取空白血浆0.2 mL,加入20 μL 10%三氯乙酸-水沉淀蛋白,加入0.11 g·L⁻¹间羟基苯甲酸10 μL,涡旋2 min,加0.6 mL乙酸乙酯萃取,涡旋2 min,8 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液,重复3次。合并乙酸乙酯层,氮气保护吹干,加0.2 mL流动相(甲醇-0.2%甲酸水溶液15:85)溶解,0.45 μm水系微孔滤膜过滤,4℃冷藏备用。

2.2 对照品、内标溶液的制备 精密称取DSS 4.4 mg,PA 1.4 mg,PAL 1.2 mg,用15%甲醇-0.2%甲酸水溶液溶于10.0 mL棕色量瓶中,稀释并加至刻度,摇匀,制备成质量浓度分别为440.0,140.0,120.0 mg·L⁻¹的DSS,PA,PAL混合对照品溶液。精密称取间羟基苯甲酸适量,加水制备成110.0 mg·L⁻¹的内标溶液,4℃保存,备用。

[稿件编号] 20100622003

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目(2010JM4047);陕西省中医药管理局项目(2007-25-6);陕西省教育厅研究专项(2010JK867)

[通信作者] *郑晓晖,教授,博士生导师,主要从事复方药物代谢应答与分析研究,Tel:(029)88302686,E-mail:zhengxh@nwu.edu.cn

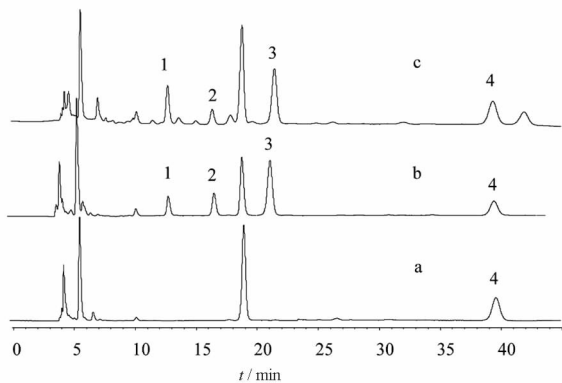
2.3 空白血浆加标准供试溶液的制备 取0.2 mL空白血浆,精密加入2.2项下混合对照品和内标溶液各10.0 μL,按2.1项下样品处理方法处理,即得空白血浆加DSS,PA,PAL混合标准供试品溶液。

2.4 给药与取血方案 取健康SD大鼠6只禁食,自由饮水。按5.0 mL·kg⁻¹尾静脉注射香丹注射液(DSS 1.95 g·L⁻¹,PA 0.006 g·L⁻¹,PAL 0.37 g·L⁻¹)于0,2,5,10,20,30,60,90,120,150,180 min眼底取血0.5 mL,置于肝素化离心管中,8 000 r·min⁻¹离心10.0 min,分离血浆,备用。

2.5 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5.0 μm);流动相甲醇-0.2%甲酸水溶液15:85;流速0.8 mL·min⁻¹;柱温25℃;检测波长280 nm;进样量50 μL。

3 结果

3.1 专属性及检测限 在拟定分析条件下,注入空白血浆供试品溶液和空白血浆加DSS,PA,PAL混合对照品溶液各50.0 μL,记录色谱图(图1)。结果表明,空白血浆中的杂质不干扰DSS,PA,PAL的测定。检出限分别为0.34,0.10,0.09 mg·L⁻¹(S/N=3),定量限分别为1.21,0.43,0.40 mg·L⁻¹(S/N=10)。



1. DSS; 2. PA; 3. PAL; 4. 间羟基苯甲酸。

图1 空白血浆(a)、空白加混标(b)、香丹注射液含药血浆(c)的HPLC图

3.2 线性关系考察 精密吸取血浆0.2 mL,加入适量DSS,PA,PAL混合对照品溶液,110.0 mg·L⁻¹间羟基苯甲酸10.0 μL,制得系列浓度供试品溶液(DSS:44.0,22.0,11.0,5.50,2.75,0.68 mg·L⁻¹;PA:14.0,7.0,3.50,1.75,0.87,0.43 mg·L⁻¹;PAL:12.0,6.0,3.0,1.50,0.75,0.38 mg·L⁻¹)。

按2.1项样品处理方法制备样品,在拟定色谱条件下进样50.0 μL,记录峰面积。以待测物峰面积与内标的峰面积比值为纵坐标(Y),进样浓度为横坐标(X,mg·L⁻¹)进行回归分析,得回归方程分别为DSS, $Y=0.062\ 5X-0.033\ 5(r=0.999\ 8)$;PA, $Y=0.027\ 95X+0.001\ 4(r=0.999\ 9)$;PAL, $Y=0.575\ 5X-0.109\ 4(r=0.999\ 9)$ 。结果表明DSS在0.68~44.0 mg·L⁻¹,PA在0.43~14.0 mg·L⁻¹,PAL在0.38~12.0 mg·L⁻¹具有良好的线性关系。

3.3 精密度和回收率 取空白血浆适量,加入适量DSS,PA,PAL混合对照品溶液,配制成系列浓度血样,按2.1项下样品处理方法制备样品溶液,在拟定的色谱条件下日内重复进样5次;将上述样品溶液在5 d内连续测定5次,记录峰面积,分别计算日内,日间精密度和回收率(表1)。

表1 DSS,PA,PAL的回收率和精密度(n=6)

对照品	质量浓度 /mg·L ⁻¹	回收率 /%	精密度 RSD/%	
			日内	日间
丹参素	10	96.2±0.4	0.4	1.3
	2.5	97.3±0.6	1.5	1.4
	1.0	98.8±0.9	1.2	1.6
原儿茶酸	10	99.2±1.2	1.0	1.3
	2.5	98.9±1.1	1.2	1.6
	1.0	98.3±2.0	1.8	2.0
原儿茶醛	10	99.1±0.5	0.8	1.0
	2.5	97.8±1.9	1.9	2.6
	1.0	98.5±2.7	2.4	4.8

3.4 稳定性试验 取空白血浆样品,加入适量DSS,PA,PAL混合标准溶液,得到低、中、高浓度(1.0,2.5,10.0 mg·L⁻¹)的空白血浆加对照品溶液,室温下放置4.0,6.0,8.0,10.0,12.0,24.0 h,按样品处理方法进行处理,在拟定分析条件下进样50.0 μL,测定3个浓度的RSD分别为DSS 2.7%,2.8%,3.2%;PA 2.3%,2.3%,3.8%;PAL 3.1%,4.6%,4.1%。提示样品在24 h内稳定。

3.5 血药浓度及药代动力学研究 取2.4项下血浆样品50 μL,在拟定的色谱条件下进样分析,按标准曲线计算DSS,PA,PAL的浓度,以时间(t)为横坐标,血药浓度(c)为纵坐标绘制药时曲线(图2)。DAS2.0药动学软件拟合房室模型,结果显示DSS,PA,PAL呈二室开放模型,主要的药代动力学参数见表2。