

2005,14(3):159-161.

[6] 董锡臣,付朝晖,张文众,等. 改良 RP-HPLC 法测定血浆中罗哌卡因的含量[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006,11(2):178-180.

[7] 杜文力,王明霞,郭向晖,等. 反相高效液相色谱法测定产妇脐带血中罗哌卡因浓度 [J]. 中国现代应用药学, 2005,22(1):60-61.

[8] 徐红蓉,汪红,吕迁洲,等. 高效液相色谱法测定罗哌卡因在家兔体内的血药浓度[J]. 中国药房,2004,15(2):80-82.

[9] 王珊娟,张马忠,周颖,等. 下腹部手术患者硬膜外注射甲磺酸罗哌卡因的药理学[J]. 中华麻醉学杂志, 2001,26(9):810-812.

[10] 李雪宁,许剑安,陈伟力,等. LC-MS/MS 法测定手术患者中罗哌卡因注射液的血浓度及药理学[J]. 中国临床药理学杂志,2006,15(5):283-286.

[11] HALLSEN T G, ILETT K F, LIM S I, *et al.* Pharmacokinetics and clinical efficacy of long-term epidural ropivacaine infusion in children [J]. *Br J Anaesth*,2000, 85(3):347-353.

丹参注射液对大鼠体内稳态华法林药动学和药效学参数的影响

谢红娟¹,付海英²,朱彩凤³,黄楨¹,Charles D. Sands⁴

(1. 上海市长宁区中心医院药剂科,200336; 2. 上海市吴泾医院内科,200241; 3. 延边大学药学院,延吉 133000; 4. 山佛大学临床药学部,伯明翰,美国)

[摘要] 目的 探讨丹参注射液对大鼠体内稳态华法林药动学和药效学参数的影响。方法 采用平行、随机的实验设计。丹参注射液 5 g · kg⁻¹ 腹腔注射给药, bid, 连续 9 d; 华法林 0.2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 灌胃给药, 每天 1 次连续 9 d。分别在给药的第 1, 6 和 10 天从尾动脉抽取血样测定血药浓度和凝血酶原时间 (PT)。结果 丹参对 PT 值没有影响 (P>0.05), 当丹参和华法林合用时, 丹参增加华法林的血药浓度 (P<0.05), 改变华法林的药动学参数 (P<0.05) 和药效学主要参数 INR (P<0.05)。结论 丹参和华法林联合用药时发生相互作用, 可能导致出血, 应注意监测。

[关键词] 丹参; 华法林; 药动学; 药效学; 药物相互作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2009)01-0036-04

Effects of *Danshen* Injection (*Salvia miltiorrhiza*) on Pharmacodynamics and Pharamcokinetics of Warfarin in Rats

XIE Hong-juan¹, FU Hai-ying², ZHU Cai-feng³, Huang Zhen¹, Charles D. Sands⁴ (1. *Department of Pharmacy, the Central Hospital of Changning District, Shanghai 200336, China*; 2. *Department of Internal Medicine, Wujing Hospital, Shanghai 200241, China*; 3. *College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133000, China*; 4. *Clinical Pharmacy Department of Samford University, Birmingham, Alabama, USA*)

ABSTRACT Objective To determine of *danshen* injection influences pharmacodynamics and pharamcokinetics of warfarin in a steady-state *in vivo*. **Methods** A parallel and randomization test was designed. *Danshen* was administered i. p. in a dose of 5 g · kg⁻¹ twice daily for 10 days and warfarin was given i. g. in a dose of 0.2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ orally for 10 days. Blood samples for PT and Cp were collected from tail artery and measured on days 1 (prior to drug administration), 6 and 10.

Results *Danshen* had no significant effect on PT (P>0.05). However, *Danshen* significantly increased the blood concentration of warfarin (P<0.05), and modified both the pharmacokinetics and INR (P<0.05), the main parameters of pharmacodynamics of warfarin. **Conclusion** Drug interactions could happen by combination of *danshen* and warfarin, which may lead to serious bleeding episodes. Therefore, the use of them should be monitored carefully.

KEY WORDS *Danshen*; Warfarin; Pharamcokinetics; Pharmacodynamics; Drug Interaction

华法林 (warfarin) 是临床广泛应用的一种香豆素类口服抗凝血药, 主要用于预防各种凝血。但华法林治疗指数窄, 副作用大, 个体差异大。当它的凝血因子 II 时间国际标准比值 (international normalized ratio, INR) 稍稍高出正常值范围时, 患者就会出现出血, 当

稍稍低于正常值范围时, 患者又会出现凝血, 出血和凝血都会严重威胁患者的生命。华法林容易和多种药物、食物发生相互作用而导致严重不良反应^[1]。有病例报道, 丹参提取液和华法林之间有相互作用^[2-4]。实验研究表明, 丹参提取液能够改变大鼠体内单剂量

华法林药动学和药效学参数^[5,6]。在临床上,华法林和丹参都不是单剂量使用。目前有关丹参对稳态华法林药动学和药效学参数的影响,笔者尚未见报道。本实验采用平行实验设计,以大鼠尾动脉血的血药浓度和 INR 为主要指标,研究丹参注射液对大鼠体内稳态华法林药动学和药效学的影响。

1 材料

1.1 药品 丹参注射液(上海第一生化制药厂,批号:991203);华法林钠片(DuPont Pharma Wilmington, Delawar 19880LOT KO441A);华法林钠标准品(Sigma 公司,批号:14508);甲醇(长春市化学试剂厂,批号:950306);柠檬酸钠(哈尔滨市华工试剂,批号:851102);磷酸二氢钾(天津开发区海晶精细化工厂部,批号:990520);磷酸氢二钾(沈阳市试剂三厂,批号:940301);乙腈(Tedia Company, Inc, USA 001100);PT 测定试剂 Thromborel(Dade Behring Marburg GmbH D-35041 Marburg, Germany 50549429);标准血浆粉(PT = 11.5s, ISI = 1.07, Dade Behring Marburg GmbH D-35041 Marburg, Germany 52810220)。

1.2 动物 Wistar 大鼠,雄性,体重 180 ~ 250 g,延边大学医学院动物科提供。

1.3 仪器 CA-530 型凝血因子 II 测定仪(日本东亚公司生产);HPLC 色谱仪(日本岛津公司生产);XW-80A 漩涡混合器(上海医科大学仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 动物实验

2.1.1 华法林钠溶液的制备 取华法林钠 2 片(每片 5 mg),在研钵中逐渐加入吐温-80 少量,共研,直至糊状,加入 200 mL 的纯化水混匀即可。所配溶液华法林钠浓度为:0.05 mg · mL⁻¹。

2.1.2 分组与给药 参考文献[7],将 18 只 Wistar 大鼠按体重随机分为 3 组,每组 6 只:丹参组、华法林组、丹参+华法林组。丹参组于每天早晚腹腔注射丹参注射液 5 g · kg⁻¹,连续给药 9 d;华法林组于每天早上灌胃给予华法林钠溶液 1 次,剂量为 0.2 mg · kg⁻¹,连续给药 9 d;丹参+华法林组每天早晚腹腔注射丹参注射液 5 g · kg⁻¹,每天早上灌胃给华法林钠溶液 1 次,

剂量为 0.2 mg · kg⁻¹,连续给药 9 d。

2.1.3 血样的采集与处理 在乙醚的轻度麻醉下,用 7 号头皮针从大鼠尾动脉取血 0.9 mL,立即与 38% 柠檬酸钠 0.1 mL 混合,在 3 500 r · min⁻¹ 下离心 15 min 后,取血清-25 °C 冷冻保存,待测血药浓度和凝血酶原时间(PT)。分别在给药前 1 d 抽取空白血样,在实验的第 6 天给药之前抽取血样,在实验的第 10 天抽取血样,每只大鼠每次抽取血样的时间相同。

2.2 PT 测定和 INR 值的计算

2.2.1 标准曲线的绘制 取一个单位血浆标准样品,加入纯化水 1 mL,轻轻震荡摇匀即得血浆标准液。将标准血浆液(100%)放入 PT 测定仪中,仪器使其自动稀释成含血浆 100%,80%,60%,40%,20%,0% 的血浆液,分别测定 PT 值,并以血浆浓度对 PT 进行线性回归,得回归方程为 $\lg P = -0.810 \lg T + 3.970$, $r = -0.9999$ 。结果表明血浆浓度与 PT 呈良好的线性关系。

2.2.2 精密度实验 日内精密度实验:取 PT 值为 11.5 的标准血浆 3 份,每份反复测定 5 次,其平均 RSD 为 1.01%。日间精密度实验:每日取一份 PT 值为 11.5 的标准血浆,反复测定 3 次,连续测定 5 d,其平均 RSD 为 1.56%。

2.2.3 准确度实验 取 PT 值为 11.5 的标准血浆 3 份,每份反复测定 3 次,其结果如表 1 所示。

表 1 PT 测定的准确度实验

编号	PT 标准值/ s	测定值/s			RSD/ %
		1	2	3	
1	11.5	11.4	11.5	11.6	10.0
2	11.5	11.7	11.5	11.5	11.5
3	11.5	11.5	11.3	11.6	15.2

2.2.4 大鼠 PT 的测定 将-25 °C 保存的血清样品取出后,在(37±1) °C 的水浴中速溶,采用干燥的 PT 试剂,用 PT 测定仪测定 PT 值。根据公式 $INR = (\text{patients' PT} / \text{normal mean PT})^{ISI}$ 计算 INR 值。

2.3 华法林血药浓度的测定

2.3.1 检测波长的选择 根据文献[8],华法林的两个最大紫外吸收波长为 $\lambda_{max} = 210$ 或 305 nm,因为在本实验条件下,在 $\lambda_{max} = 210$ nm 处,样品中共存组分吸收峰强,干扰太多,所以本实验采用 $\lambda_{max} = 305$ nm 处进行测定。

2.3.2 色谱条件 色谱柱:美国 Waster 公司 Symmetry C₁₈(3.9 mm × 150 mm, 5 μm);流动相:甲醇-磷酸盐缓冲液(pH 值 = 5.8)(55 : 35);流速:1.0 mL · min⁻¹;进样量:20 μL;检测波长:305 nm;内标物:羟苯乙酯。样品和内标的保留时间分别为 2.5 和 3.5

[收稿日期] 2007-10-30

[作者简介] 谢红娟(1974-),女,吉林人,主管药师,博士,从事临床药学工作。电话:021-62909911-1336, E-mail: xhj0505@gmail.com。

min。内标和样品的色谱图见图 1。

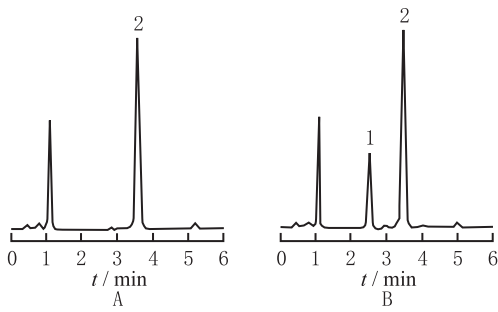


图 1 内标物及样品的 HPLC 图谱

A. 内标物(缺华法林); B. 内标物和华法林; 1. 华法林, 2. 内标物

2.3.3 华法林钠标准溶液的配制 精密称取华法林钠标准品约 2.0 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加适量的乙腈溶解, 加乙腈至刻度, 摇匀, 即得标准品溶液。

2.3.4 内标溶液的配制 精密称取对羟基苯甲酸乙酯标准品 2.0 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加适量的乙腈溶解, 加乙腈至刻度, 摇匀即得内标溶液。

2.3.5 回归方程的绘制 精密吸取空白血清 0.2 mL 7 份, 分别加入华法林钠标准液 0.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 25.0 和 50.0 μL , 加入乙腈 0.6 mL, 并置于漩涡混合器中混合 15 min 后, 放入离心机中, 在 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 沉淀血浆蛋白后, 取上清液 0.6 mL, 按上述色谱条件进行测定, 以华法林和内标物的峰面积比值对华法林的血药浓度进行线性回归, 得回归方程: $Y = 0.016\ 669X - 0.000\ 99$ ($r = 0.999\ 9$, $n = 7$), 最低检测限量为 0.39 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3.6 精密度实验 取华法林钠标准液, 分别稀释成为 2.5, 5.0 和 50.0 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度, 按血样的处理方法操作, 日内于 0, 1, 2, 4, 6, 12 h 测定, 日间于每日同一时间测定, 连续测定 6 d, 计算日内与日间差异。结果见表 2。

表 2 华法林血药浓度测定的精密度实验

	加入量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测定值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/ %
日内	2.50	2.64±0.04	1.51
	5.00	4.86±0.24	4.94
	50.00	48.80±1.40	2.87
日间	2.50	2.52±0.05	1.98
	5.00	5.39±0.20	3.71
	50.00	49.20±1.60	3.25

2.3.7 回收率实验 于空白血浆中加入一定量的华法林钠, 按血样的处理方法操作, 由回归方程求其含量, 计算回收率。结果见表 3。

表 3 华法林血药浓度测定的回收率实验

编号	加入量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测定值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/ %
1	2.50	2.42±0.03	96.80
2	5.00	4.71±0.74	94.20
3	10.00	9.58±1.08	95.80

2.3.8 血药浓度的测定 将冷冻保存的血样溶化后, 精密量取 0.2 mL, 加入浓度为 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内标液 100 μL , 加入乙腈 0.6 mL, 漩涡震荡 15 min 后离心 15 min, 精密吸取上清液 0.6 mL, 进样 20 μL , 将华法林峰面积与内标物峰面积比值代入标准曲线方程, 即可求出各大鼠的血药浓度, 并计算其药动学参数。结果见图 2 和表 4, 5。

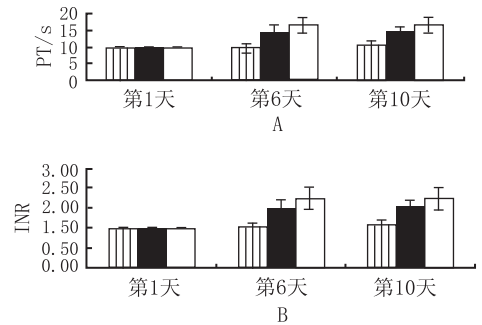


图 2 3 组不同时间 PT 值和 INR 检测结果

□□□ 丹参; ■ 华法林; □ 丹参+华法林; A. PT 值; B. INR

表 4 3 组大鼠在第 6 和第 10 天的华法林血药浓度测定

结果	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}, \bar{x} \pm s$						
组别与时间	1	2	3	4	5	6	平均值
华法林组							
第 6 天	9.92	9.28	7.04	11.20	8.32	10.87	9.44±1.44
第 10 天	8.95	7.80	8.31	11.20	8.59	10.23	9.38±1.10
丹参+华法林组							
第 6 天	11.52	8.96	8.92	11.84	9.60	10.24	10.87±1.53 ^{*1}
第 10 天	12.80	9.92	9.28	13.43	11.20	12.48	11.52±1.52

与第 10 天比较, ^{*1} $P < 0.05$

2.4 统计方法的选择 参照文献[9], 根据给药前第 1 天三组大鼠的 PT 值, 其中 PT 的中值为 9.80 s 和平均值 9.82 s 基本相等, 可以认为在整个实验中数据呈正态分布。在药效学试验中, 有一个离散型变量(药物), 该变量有 3 个水平(丹参、华法林、华法林加丹参), 还有一个连续型的变量 PT, 整个实验中数据呈正态分布, 根据 Flow Charts 选择 ONE-WAY ANALYSIS OF VARIANCE (ANOVA) 进行统计分析^[8]。在药效学试验中, 选择 t 检验进行统计分析。所有统计分析采用 SPSS10.0 软件。

2.5 数据分析

2.5.1 药效学实验的组内分析 丹参组: 对第 1, 6,

表 5 华法林组和丹参+华法林组华法林药动学参数

组别	浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	清除率/($\text{mL} \cdot \text{h}^{-1}$)	$t_{1/2}/\text{h}$	K_e/h
华法林组	9.41±1.29	17.8±2.4	11.14±1.54	0.063±0.009
华法林+丹参组	11.11±1.69	15.5±2.0	13.12±1.99	0.054±0.008

与华法林+丹参组比较, * $P < 0.01$

10 天的 PT 和 INR 进行比较, P 值分别为 0.054 和 0.332, 均 > 0.05 , 差异无显著性。表明丹参本身对 PT 和 INR 影响不大, 可以忽略。华法林组: 方差分析结果 $P < 0.05$, 在第 1, 6, 10 天的 PT 和 INR 差异有显著性, 进一步 BONFERONNI T 检验表明, 第 1 天和第 6 天, 第 1 天和第 10 天的结果比较, 差异有显著性, P 均 < 0.05 , 但第 6 天和第 10 天的 PT 和 INR 值差异无显著性, 表明华法林的血药浓度已经达到稳态。华法林加丹参组: 统计结果分析与华法林组相同。

2.5.2 药效学实验的组间分析 第 1 天: 3 组之间的 PT 和 INR 方差分析结果 $P = 0.546$ 和 $P = 0.972$, 表明 3 组之间的 PT 和 INR 值之间差异无显著性。第 6 天: 方差分析结果 P 值均 < 0.05 , 表明 3 组之间的 PT 和 INR 值差异有显著性, 进一步的 BONFERONNI t 检验表明丹参组和华法林组之间, 丹参组和丹参+华法林组之间差异有显著性, P 值均 < 0.05 。同华法林组比较, 丹参+华法林组 PT 和 INR 有一个显著性增加, 但 PT 的增加差异无显著性 ($P > 0.05$), INR 的增加差异有显著性 ($P < 0.05$)。第 10 天: PT 和 INR 方差分析结果和第 6 天的结果相同。

2.5.3 药动学实验的结果分析 华法林组和丹参+华法林组之间的药动学参数均差异有显著性, 所有 P 值均 < 0.05 。

3 讨论

本实验的结果显示, 丹参对大鼠的凝血时间影响不大, 但能够增加华法林的 PT 值, 虽然差异无显著性 ($P > 0.05$), 但对于华法林这样治疗指数窄的药物, 具有重要的临床意义。本实验中 INR 是药效学的主要参数, 丹参增加华法林的 INR, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。PT 和 INR 都是临床上判断凝血因子 II 时间的指标。PT 是一个相对值, 它的大小和试剂有关, 同样的血样用不同的试剂测定, 会有不同的 PT 值。INR 值则消除了试剂对凝血因子 II 时间的影响, 使得用不同试剂测定的凝血因子 II 时间可以进行比较, 是国际上公认的测定凝血酶原时间的指标。所以对于 PT 和 INR 统计学结果之间的差异, 并不矛盾。

华法林组和丹参+华法林组之间的药动学参数均差异有显著性, 所有 P 值均 < 0.05 。说明丹参改变了

大鼠体内稳态华法林的药动学参数, 延长华法林的半衰期, 增加了稳态血药浓度, 降低清除率。对于华法林这样治疗指数窄, 副作用大的药物, 如果两种药物同时使用, 将大大增加华法林出血的倾向。这种药动学参数的改变将非常危险。

综上所述, 丹参注射液能够增加大鼠体内稳态华法林的药动学和药效学参数, 所以临床上同时使用时应小心监测。

[DOI] 10.3870/yydb.2009.01.011

[参考文献]

- [1] HOLBROOK A M, PEREIRA J A, LABIRIS R, et al. Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions[J]. *Arch Intren Med*, 2005, 165(10): 1095-1106.
- [2] Cheng T O. Warfarin danshen interaction[J]. *Ann Throac Surg*, 1999, 67(3): 894.
- [3] TAM L S, CHAN T Y K, LEUNG W K, et al. Warfarin interactions with traditional Chinese medicines: danshen and methyl salicylate medicated oil[J]. *Aust N Z J Med*, 1995, 25(3): 258.
- [4] YU C M, CHAN J C N, SANDERSON J E. Chinese herbs and warfarin potentiation by 'danshen' [J]. *J Int Med*, 1997, 241(4): 337-339.
- [5] LO A C T, CHAN K, YEUNG J H K, et al. The effects of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) on pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in rats[J]. *Eur J Drug Met Pharma*, 1992, 17(4): 257-262.
- [6] CHAN K, LO A C T, YEUNG J H K, et al. The effects of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) on warfarin pharmacodynamics and pharmacokinetics of warfarin enantiomers in rats[J]. *J Pharm Pharmacol*, 1995, 47(5): 402-406.
- [7] IMAN Y Z. Effect of ciprofloxacin on the hypoprothrombinemic activity of warfarin in rats[J]. *Int J Pharm*, 1996, 131(3): 131-136.
- [8] 梁统, 丁航, 李杰, 等. 血清中华法林浓度的反相高效液相色谱分析[J]. *现代应用药学*, 1996, 13(5): 45-47.
- [9] DEMUTH J E. *Basic statistical and pharmaceutical statistical applications* [M]. New York: Marcel Dekker, 1999: 566-569.