

丹参片和丹参注射液对多柔比星在大鼠体内药动学的影响

李光慧^{1*}, 戴维², 李芳萍¹, 张晓丹¹, 袁媛¹, 赵永红¹, 季瑛¹, 梁建英^{2#}(1.上海市静安区中心医院/复旦大学附属华山医院静安分院, 上海 200040; 2.复旦大学药学院药物分析教研室, 上海 200032)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)01-0067-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.01.22

摘要 目的: 研究联用丹参片/丹参注射液对多柔比星在大鼠体内药动学的影响。方法: 18只SD大鼠随机均分成A、B、C3组。A组大鼠左颈iv多柔比星8 mg/kg; B组: 左颈iv丹参注射液0.5 ml, 0.5 h后左颈iv多柔比星8 mg/kg; C组大鼠ig丹参片混悬液1 ml(18片溶于50 ml纯水), 7 d后左颈iv多柔比星8 mg/kg。3组大鼠分别于给药后0.083、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、12、24 h于右颈静脉取血0.6 ml制备血浆, 高效液相色谱法测定其血药浓度, 3p97软件计算药动学参数, 比较3组药动学参数的差异。结果: 与A组比较, B组CL、 V_{ss} 升高, AUC_{0-7} 降低($P < 0.05$); C组 V_{ss} 降低($P < 0.05$), k_{10} 增加、 $t_{1/2\beta}$ 减小。结论: 丹参片/丹参注射液均可提高多柔比星进入各组织的分布速度, 两药联用可能会提高肿瘤部位的药物浓度。

关键词 多柔比星; 丹参片; 丹参注射液; 药动学; 高效液相色谱法; 大鼠

Effects of Danshen Tablets and Danshen Injection on the Pharmacokinetics of Doxorubicin in Rats *in vivo*

LI Guanghui¹, DAI Wei², LI Fangping¹, ZHANG Xiaodan¹, YUAN Yuan¹, ZHAO Yonghong¹, JI Ying¹, LIANG Jianying²(1. Shanghai Jing'an District Central Hospital/Jing'an Branch, the Affiliated Huashan Hospital of Fudan University, Shanghai 200040, China; 2. Teaching and Research Room of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of Danshen tablets or Danshen injection combination on the pharmacokinetics of doxorubicin in rats *in vivo*. METHODS: 18 SD rats were randomly divided into group A, B and C. Group A was given doxorubicin 8 mg/kg intravenously via left jugular trunk; group B was given Danshen injection 0.5 ml intravenously via left jugular trunk, and 0.5 h later given doxorubicin 8 mg/kg intravenously via left jugular trunk; group C was given Danshen suspension 1 ml (18 tablets dissolved in 50 ml pure water) intragastrically, and 7 d later given doxorubicin 8 mg/kg intravenously via left jugular trunk. 0.6 ml venous blood were extracted from the right jugular vein 0, 0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 hours after medication. The plasma concentration of doxorubicin was determined by HPLC; the pharmacokinetic parameters were calculated by using 3p97 software; the difference of pharmacokinetic parameters were compared among 3 groups. RESULTS: Compared with group A, CL and V_{ss} of group B increased while AUC_{0-7} decreased ($P < 0.05$); V_{ss} of group C decreased ($P < 0.05$), k_{10} increased and $t_{1/2\beta}$ decreased. CONCLUSIONS: Danshen tablet/Danshen injection can increase the distribution speed of doxorubicin into tissues, and both can improve the concentration of drug in tumor focus.

KEYWORDS Doxorubicin; Danshen tablets; Danshen injection; Pharmacokinetics; HPLC; Rat

化疗是综合治疗恶性肿瘤必不可少的手段, 但化疗药物的毒性及耐药性往往会限制化疗的持续进行。中药在疾病治疗中具有整体调控和多因素调节的优势, 可起到化疗辅助作用, 这也成为近年来研究的热点之一^[1-2]。多柔比星是作用

于DNA的细胞毒蒽环类抗生素, 可用于恶性实体瘤的化疗。多柔比星经iv给药后, 在血浆中会被迅速消除并广泛分布于体内, 经肝脏代谢后随胆汁排泄出体外。但多柔比星具有骨髓抑制、心脏毒性、肿瘤细胞耐药等一系列问题, 限制了其应用^[3]。

效性研究[J]. 中国药房, 2010, 21(18): 1 667.
[4] 曾檀, 霍丹群, 周祥敏, 等. 高效液相色谱法测定米格列奈钙原料药的有关物质[J]. 中国药业, 2013, 22(17): 28.
[5] Liu J, Yang Y, Ji R. A practical and efficient preparation of (s)-2-benzylsuccinic acid: a key acid synthon of KAD-1229[J]. *Synthetic Communications*, 2004, 34(14): 2 633.

[6] Hekking KF, Lefort L, de Vries AH, *et al*. Synthesis of versatile building blocks through asymmetric hydrogenation of functionalized itaconic acid mono-esters[J]. *Adv Synthesis*, 2008, 350(1): 85.
[7] Yamaguchi T, Yanagi T, Hokari H, *et al*. Preparation of optically active succinic acid derivatives. II. efficient and practical synthesis of KAD-1229[J]. *Chem Pharm Bull*, 1998, 46(2): 337.

* 主管药师, 硕士。研究方向: 临床药理、临床药学。电话: 021-61578133。E-mail: lgh_britney@hotmail.com
通信作者: 副教授, 硕士。研究方向: 药物分析学。电话: 021-51980056。E-mail: jyliang@shmu.edu.cn

(收稿日期: 2015-04-16 修回日期: 2015-05-22)
(编辑: 刘萍)

丹参为唇形科植物,活性成分主要存在于干燥的根茎,其味苦、性微寒,具有祛瘀止痛、活血调经、养心除烦等多种功效。其化学成分复杂,以脂溶性的二萜醌类化合物与水溶性的酚性酸类化合物为主^[1]。近年来多项研究显示,丹参对多柔比星所致心肌损害、肾脏损害具有保护作用,且能逆转多柔比星的多药耐药作用^[5-8],但对联用丹参后多柔比星体内药动学过程的国内外文献报道甚少。故笔者参照文献报道^[9-11],建立多柔比星与丹参注射液/丹参片(丹参的2种常用剂型)联合用药大鼠模型,旨在研究中药丹参对多柔比星在动物体内药动学变化的影响,为多柔比星合理联用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

1100 高效液相色谱(HPLC)仪(美国 Agilent 公司);7725i 手动进样器(美国 Rheodyne 公司);LXJ-04 离心机(上海医用分析仪器厂);HHS 11-2B 电热恒温水浴锅(上海医疗器械五厂);KW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

多柔比星对照品、柔红霉素对照品(复旦大学药学院药理学教研室惠赠,批号:U991102、001001,纯度:98.4%、98.6%);多柔比星注射液(浙江海正药业有限公司,批号:081003A,规格:5 ml:10 mg);丹参片(上海雷允上药业有限公司,批号:070536,规格:0.3 g/片);丹参注射液(上海中西制药有限公司,批号:070103,规格 2 ml:3 g);乙腈、甲醇为色谱级(美国 TE-DIA 公司);其余试剂均为分析纯,水为去离子水。

1.3 动物

SD 大鼠,18 只,♀,体质量 200~300 g,购于复旦大学实验动物部[合格证号为 SCXK(沪)2002-0002]。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex®ODS(250 mm×4.6 mm,5 μm);预柱:Gemini C₁₈(4.0 mm×3.0 mm);柱温:30 ℃;流动相:10 mmol/L 磷酸二氢钾溶液(磷酸调 pH 为 3.0)-乙腈(69:31,V/V);流速:1.0 ml/min;激发波长(λ_{ex}):490 nm,发射波长(λ_{em}):550 nm;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品贮备液的制备 多柔比星对照品 3.0 mg,精密称定,置于 10 ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,作为对照品贮备液,于 4 ℃ 冰箱中保存,备用。

2.2.2 标准曲线工作液的制备 精密量取对照品贮备液适量,用甲醇稀释成多柔比星质量浓度分别为 30 μg/ml 的工作液 I、3 μg/ml 的工作液 II 和 0.3 μg/ml 的工作液 III,于 4 ℃ 冰箱中保存,备用。

2.2.3 内标(IS)溶液的制备 精密称取内标柔红霉素对照品 4.0 mg,置于 100 ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,作为 IS 贮备溶液,置于 4 ℃ 冰箱中保存,备用。精密量取 IS 贮备溶液适量,用甲醇稀释成多柔比星质量浓度为 4.0 μg/ml 的 IS 溶液。

2.2.4 血浆样品的制备 取“2.2.2”项下各多柔比星标准曲线工作液,加入空白大鼠血浆制成多柔比星质量浓度分别为 0.025、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 μg/ml 的标准大鼠血浆样品。

2.3 血浆样品的处理

精密量取血浆 0.3 ml 和 IS 溶液 30 μl,置于离心管中,加入二氯甲烷 1.5 ml,混匀,1 600×g 离心 10 min,将下层有机层转移至试管中,40 ℃ 水浴氮气吹干,加入 100 μl 流动相溶解残

渣,精密吸取 20 μl 进样分析。

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性试验 分别取大鼠空白血浆、空白血浆+工作液 II +IS 溶液、给药 15 min 后血浆+IS 溶液,按“2.3”项下方法处理后,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱。结果显示,多柔比星、内标柔红霉素的保留时间分别为 4.3、7.7 min,两者峰形良好、分离完全,内源性物质不干扰多柔比星的测定。色谱图见图 1。

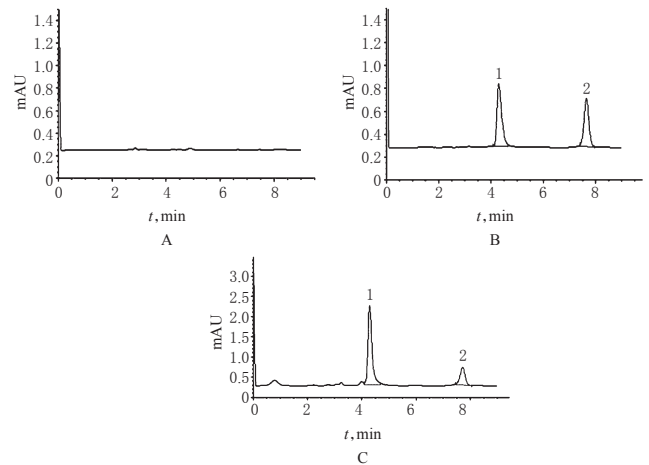


图 1 高效液相色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+工作液 II +IS 溶液; C. 给药 15 min 血浆+IS 溶液; 1. 多柔比星; 2. 柔红霉素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma+working fluid II +IS solution; C. plasma after 15 min administration+IS solution; 1. doxorubicin; 2. daunorubicin

2.4.2 线性关系考察 取“2.2.4”项下制备的系列质量浓度标准大鼠血浆样品,每个质量浓度平行制备 3 份。以多柔比星峰面积与柔红霉素峰面积比值(Y)对多柔比星质量浓度(c, μg/ml)作加权(1/c²)线性回归,得标准曲线回归方程为 Y=2.0825c+0.010(r=0.998 8)。结果表明,多柔比星检测质量浓度的线性范围为 0.025~2.00 μg/ml。

2.4.3 定量限和检测限考察 取已知质量浓度(0.20 μg/ml)的加样血浆 0.3 ml,按“2.3”项下步骤操作后,按“2.1”项下色谱条件进行 HPLC 分析,记录色谱。分别以信噪比为 10 和 3 计算定量限和检测限。结果表明,多柔比星检测的定量限和检测限为 0.025 μg/ml,检测限为 0.01 μg/ml。

2.4.4 精密度试验 取“2.2.2”项下各多柔比星工作液适量加入空白血浆中,制备成多柔比星质量浓度分别为 0.025、0.20、1.00 μg/ml 的质控血浆样品,按“2.3”项下方法操作后按“2.1”项下色谱条件进样分析。每个质量浓度同日内连续测定 5 次,考察日内精密度;连续测定 3 d,考察日间精密度。结果显示,低、中、高质量浓度样品的日内、日间 RSD 均小于 12%(n=5),符合生物样品检测标准。

2.4.5 回收率试验 测定“2.4.4”项下制备的低、中、高 3 个质量浓度的样品各 5 次,将多柔比星峰面积与柔红霉素峰面积之比代入“2.4.2”项下标准曲线,计算方法回收率,结果平均方法回收率为 101.71%,RSD=8.96%(n=5);同方法测定低、中、高 3 个质量浓度各 5 次的峰面积与未经提取的进样量相同的多柔比星甲醇液的峰面积,计算提取回收率,结果平均提取回收率为 62.93%,RSD=6.67%(n=5)。

2.4.6 稳定性试验 取0.20 μg/ml多柔比星的样品按“2.3”项下方法处理后,放置在一20℃冰箱中,14 d后取出再测定,进行冰冻稳定性考察,结果其RSD为2.80% (n=5),说明该生物样品在一20℃冰箱中放置14 d稳定。取0.20 μg/ml的样品放置在一20℃冰箱中,反复冻融3次后进样测定,进行冻融稳定性考察,结果其RSD为2.26% (n=5),说明该生物样品在反复冻融3次条件下稳定。

2.5 药动学研究

取18大鼠随机均分成A、B、C3组,每组6只。A组:经左颈iv多柔比星8 mg/kg;B组:先左颈iv丹参注射液0.5 ml,0.5 h后再左颈iv多柔比星8 mg/kg;C组:ig丹参片混悬液1 ml(18片溶于50 ml纯水),7 d后再左颈iv多柔比星(8 mg/kg)。3组大鼠分别于给药后0.083、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、12、24 h经右颈静脉取血0.6 ml,置于含肝素离心管中,以1 600×g离心5 min。分离出血浆后,按“2.3”项下方法处理,再按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱,计算各组各时间点多柔比星的含量,并绘制药-时曲线。各参数统计学显著性差异采用t检验(α=0.05),P<0.05为差异有统计学意义。结果显示,单一用药与联合用药的多柔比星血浆浓度经3P97软件拟合后符合静脉注射二房室开放模型。主要药动学参数见表1,平均药-时曲线见图2。

表1 3组大鼠的多柔比星药动学参数比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Comparison of pharmacokinetic parameters of doxorubicin among rats in 3 groups($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	A组	B组	C组
A, h ⁻¹	6.96 ± 1.30	7.34 ± 0.86	7.83 ± 0.97
B, h ⁻¹	0.027 ± 0.010	0.020 ± 0.003	0.058 ± 0.008*
k ₂₁ , h ⁻¹	0.095 ± 0.026	0.17 ± 0.040	0.11 ± 0.029
k ₁₀ , h ⁻¹	2.27 ± 1.58	0.92 ± 0.24	4.36 ± 0.46
k ₁₂ , h ⁻¹	4.62 ± 1.20	6.27 ± 0.81	3.42 ± 1.35
t _{1/2α} , h	0.10 ± 0.020	0.096 ± 0.01	0.089 ± 0.011
t _{1/2β} , h	29.34 ± 12.51	35.52 ± 4.97	12.02 ± 1.81
CL, L/h	0.67 ± 0.14	1.25 ± 0.56*	0.71 ± 0.041
V _s , L	26.65 ± 6.09	62.09 ± 24.69*	12.39 ± 2.29*
AUC _{0-t} , (h·μg)/ml	1.49 ± 0.26	0.58 ± 0.27*	2.02 ± 0.19
MRT, h	30.37 ± 18.79	49.56 ± 4.62	7.44 ± 1.90

注:与A组比较,*P<0.05

Note: vs. A group,*P<0.05

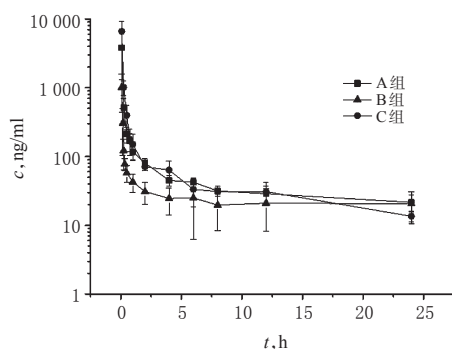


图2 3组大鼠的多柔比星平均药-时曲线

Fig 2 Average concentration-time curves of doxorubicin of rats in 3 groups

各组多柔比星药动学参数经过t检验(α=0.05)后发现:与A组比较,B组CL、V_s明显升高,AUC_{0-t}明显减小(P<0.05);C组V_s明显减少(P<0.05);其他参数虽有一定变化,但差异均

无统计学意义(P>0.05)。

3 讨论

本实验进行了丹参注射液/丹参片与多柔比星联用的药动学研究。从药-时曲线及各项药动学参数分析:(1)多柔比星联合应用丹参注射液组与单一使用多柔比星组比较,丹参注射液可显著减小多柔比星的AUC_{0-t},并显著增加多柔比星的V_s以及血浆CL。另外多柔比星联用丹参注射液组的中央室向周边室转运的一级速度常数(k₁₂)是多柔比星组的1.35倍,药物从周边室向中央室转运的一级速度常数(k₂₁)是多柔比星组的1.79倍;t_{1/2β}也有所增加,是多柔比星组的1.2倍;而药物从中央室消除的一级速度常数(k₁₀)有所减少,是多柔比星组的40.5%;其他药动学参数则与多柔比星组接近。(2)多柔比星联用丹参片组与单一使用多柔比星组比较,联用后V_s显著减小,而k₁₀有所增加,是单用多柔比星组的1.72倍;t_{1/2β}则有所减少,是多柔比星组的40.97%;其他药动学参数与多柔比星组接近。

由药动学数据可以推测:丹参注射液/丹参片与多柔比星联用均可使中央室与外周室之间相互转化的速度提高,均可能提高肿瘤部位的药物浓度。但以上推测有待组织学分布实验的进一步验证。且丹参注射液与丹参片的作用有所不同,可能是与两者成分的差异有关。丹参注射液的主要成分为酚酸等水溶性成分,而丹参片的成分还包括丹参酮等脂溶性成分,这也可能会对多柔比星组织分布的影响不同,仍待进一步验证。

参考文献

- [1] 柏茂树,伍治平,王熙才.肿瘤化疗辅助中药研究进展[J].现代肿瘤医学,2010,18(3):597.
- [2] 任永申,吕宏宇,马艳芹,等.基于CNKI高被引论文的近20年中药研究热点与发展趋势分析[J].中国药房,2015,26(18):2 456.
- [3] 梅丹宇.盐酸阿霉素脂质体脑胶质瘤靶向研究[D].上海:复旦大学,2010.
- [4] 李巧玉,刘杨,包华音.近5年丹参化学成分及药理作用研究进展[J].食品与药品,2014,16(2):145.
- [5] 曹杰红.丹参酮II_A对阿霉素所致大鼠心脏损伤的保护作用及机制研究[D].衡阳:南华大学,2013.
- [6] 王军建,胡锐.丹参酮II_A对阿霉素肾病大鼠肾小球nephrin和TGF-β₁的表达影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(19):245.
- [7] 马丙祥,董宠凯.丹参的药理作用研究新进展[J].中国药房,2014,25(7):663.
- [8] 潘登,陈可和.丹参酮II_A逆转多药耐药的体外效应研究[J].中国药房,2015,26(25):3 488.
- [9] 杨维娜,于琳华,郭尚温,等.改良阿霉素肾病大鼠模型的建立[J].西安交通大学学报:医学版,2009,30(4):445.
- [10] 余小平,张超群,覃仁安,等.复方丹参片对急性脑缺血大鼠血管新生因子影响的研究[J].中华中医药学刊,2011,28(5):1 145.
- [11] 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动学比较[J].中国中药杂志,2009,34(22):2 943.

(收稿日期:2015-10-30 修回日期:2015-11-30)

(编辑:林 静)