

丹参与三七配伍对主要活性成分药代动力学行为的影响

张丝韵, 宋敏*, 卢俊钢, 杭太俊

(中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏 南京 210009)

摘要: 比格犬分别灌胃给药丹参、三七以及丹参-三七配伍的混悬液, 用 LC-MS/MS 法测定犬血浆中丹参素、丹参酮 II_A、隐丹参酮、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁ 的浓度, 应用 BAPP2.0 计算药代动力学参数并进行统计分析, 通过比较药代动力学参数在配伍前后的变化探讨丹参与三七的配伍对这 6 个成分药代动力学行为的影响。结果显示, 配伍后丹参素、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ 的 C_{max} 均减少且 AUC 明显降低, CL_Z/F 和 V_Z/F 均有一定程度的增加, 而丹参酮 II_A、隐丹参酮的药代动力学行为未见明显变化。

关键词: 丹参; 三七; 方剂配伍; 药代动力学; LC-MS/MS

中图分类号: R969

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 11-1433-07

Effects of combination of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng* on the pharmacokinetics of their major bioactive components in Beagle dog

ZHANG Si-yun, SONG Min*, LU Jun-gang, HANG Tai-jun

(Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: After oral administration of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen in Chinese), *Panax notoginseng* (Sanqi in Chinese) and Danshen Sanqi combination suspensions to Beagle dogs, the plasma concentration-time profiles of danshensu, tanshinone II_A, cryptotanshinone, notoginsenoside R1, ginsenoside Rg1 and Rb1 were analyzed by LC-MS/MS. Pharmacokinetic parameters were calculated and analyzed with BAPP 2.0 software. The results showed that the C_{max} and AUC of danshensu, notoginsenoside R1, ginsenoside Rg1 and Rb1 in Danshen Sanqi combination group all decreased in comparison with those of Danshen or Sanqi given alone, while the CL_Z/F and V_Z/F increased to some extent. No significant differences of the pharmacokinetics of tanshinone II_A and cryptotanshinone were observed between groups.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*; *Panax notoginseng*; combination formulation; pharmacokinetics; LC-MS/MS

丹参与三七配伍用药广泛用于冠心病、心肌梗死等心血管疾病的治。复方制剂如复方丹参片、复方丹参颗粒和复方丹参滴丸等已收载于中国药典 2010 版^[1]。化学成分和药理学研究^[2]表明, 来源于丹参的酚酸类和二萜类成分以及来源于三七的皂苷类成分是该药对的主要药效物质。酚酸类成分如丹参素, 二萜类成分如丹参酮 II_A 和隐丹参酮, 皂苷类成

分如三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁, 具有改善微循环、抗血栓形成和扩张血管等作用^[3-5]。已有的药代动力学研究^[6-8]多集中于单体和药材提取物, 尚未见关于丹参与三七配伍后主要活性成分的药代动力学相互作用的报道, 而这种药代动力学相互作用引起的药效行为是中药复方药效的本质。

本文基于中药复方的整体性, 应用 LC-MS/MS 对该药对中 6 个主要药效成分 (丹参素、丹参酮 II_A、隐丹参酮、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁) 在药味单用和配伍方式下的药代动力学行为进行研究, 通过比较各成分在方剂配伍前后的药代动力学行为

收稿日期: 2010-04-25.

基金项目: 国家教育部博士点新教师基金资助项目 (20090096120004);

中国博士后科学基金资助项目 (20070411039).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-25-83271090, E-mail: cqsongmin@sina.com

的变化来探讨它们的配伍机制。

材料与方法

药品和试剂 化学对照品丹参素钠 (danshensu, 110855-200507)、吲哚美辛 (indometacin, 100258-200403)、丹参酮 II_A (tanshinone II_A, 110766-200417)、隐丹参酮 (cryptotanshinone, 110852-200305)、非诺贝特 (fenofibrate, 100733-200401)、人参皂苷 R_{g1} (ginsenoside Rg1, 110703-200726) 和黄芪甲苷 (astragaloside A, 110781-200613) 均购自中国药品生物制品检定所; 三七皂苷 R₁ (notoginsenoside R1, skh040929) 和人参皂苷 R_{b1} (ginsenoside Rb1, skh041027) 化学对照品均购自成都思科华生物技术有限公司。三七片 (规格 0.5 g/片, 批号 081001) 和丹参片 (规格 0.3 g/片, 批号 080627) 均为上海雷允上药业有限公司产品。

实验仪器 Surveyor LC-Thermo Finnigan TSQ Quantum Ultra AM 液-质系统 (美国热电公司), 含在线真空脱气机、四元梯度泵、恒温自动进样器、柱温箱、电喷雾离子源 ESI、大气压化学离子源 APCI、Xcalibur 1.4 数据分析系统。

实验动物 实验用健康成年比格犬 8 只, 体重 (10 ± 2) kg, 雌雄各半, 由南京安立默科技有限公司提供, 动物生产许可证: SCXK (苏) 2005-0003。

灌胃用混悬液的制备与含量测定

丹参混悬液 取丹参片 30 片, 置于研钵中, 研磨成粉末后加 Tween-80 1.0 mL 润湿, 加 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液适量充分研磨制成混悬液, 定量转移至 100 mL 量瓶中, 并用 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得。

三七混悬液 取三七片 20 片, 参照“丹参混悬液”项下方法制备, 即得。

丹参-三七配伍混悬液 取丹参片 30 片、三七片 20 片, 参照“丹参混悬液”项下方法制备, 即得。

混悬液的含量测定 采用 HPLC-UV^[9] 检测丹参混悬液和丹参-三七配伍混悬液中来源于丹参的主要活性成分的含量; 采用 HPLC-ELSD 法^[2] 检测三七混悬液和丹参-三七配伍混悬液中来源于三七的主要活性成分的含量。各混悬液含量测定的结果见表 1。

试验方案和样品采集 采用三周期自身对照试验设计。比格犬禁食过夜后分别灌胃给予丹参混悬液, 剂量为 1.0 mL·kg⁻¹ (相当于丹参素 0.21 mg·kg⁻¹、丹参酮 II_A 0.19 mg·kg⁻¹ 和隐丹参酮 0.20 mg·kg⁻¹), 于灌胃前及灌胃后 0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、8、

Table 1 Contents (mg·mL⁻¹) of the major components in *Salvia miltiorrhiza* (Danshen), *Panax notoginseng* (Sanqi) and Danshen Sanqi combination suspensions. *n* = 3

Component	Danshen	Sanqi	Danshen Sanqi
Danshensu	0.21	—	0.21
Lithospermic acid	0.44	—	0.44
Rosmarinic acid	0.27	—	0.27
Salvianolic acid B	4.05	—	4.05
Salvianolic acid A	0.16	—	0.16
Tanshinone II _A	0.19	—	0.19
Cryptotanshinone	0.20	—	0.20
Notoginsenoside R1	—	0.46	0.46
Ginsenoside Rg1	—	1.75	1.75
Ginsenoside Rb1	—	2.02	2.02

12 和 24 h 分别经前肢静脉取血约 3.5 mL, 置肝素化离心管中, 900×g 离心 10 min 分取血浆, 于 -80 °C 避光保存供血药浓度测定用。受试犬于服药 2 h 后统一喂食。

间隔 1 周清洗期后, 8 只受试比格犬禁食过夜后分别灌胃给予三七混悬液, 剂量为 1.0 mL·kg⁻¹ (相当于三七皂苷 R₁ 0.46 mg·kg⁻¹、人参皂苷 R_{g1} 1.75 mg·kg⁻¹ 和人参皂苷 R_{b1} 2.02 mg·kg⁻¹), 于灌胃前及灌胃后 0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、8、12、24、48、72、96 和 120 h 分别经前肢静脉取血约 3.5 mL, 其余同上操作。

间隔 3 周清洗期后, 8 只受试比格犬禁食过夜后分别灌胃给予丹参-三七配伍混悬液, 剂量为 1.0 mL·kg⁻¹ (剂量相当于丹参和三七混悬液之和), 于灌服前及灌服后 0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、8、12、24、48、72、96 和 120 h 分别经前肢静脉取血约 3.5 mL, 其余同上操作。

血浆样品的处理

丹参素的提取 精密吸取血浆样品 0.5 mL, 置 10 mL 的离心管中, 精密加入内标溶液 (1.0 μg·mL⁻¹ 吲哚美辛的甲醇溶液) 50 μL, 再加入 5 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 0.1 mL, 涡旋混匀 30 s。加乙酸乙酯 4 mL, 涡旋 3 min, 900×g 离心 10 min, 分取上清液 3 mL; 重复一次, 合并上清液, 37 °C 水浴下以氮气流吹干, 残留物加水-甲醇-冰醋酸 (40 : 60 : 0.5) 0.15 mL 涡旋溶解, 16 000×g 离心 10 min, 取上清液 20 μL 进行 LC-MS/MS 分析。按标准曲线法根据峰面积比计算血浆样品中丹参素的浓度。

丹参酮 II_A 和隐丹参酮的提取 避光操作。精密吸取血浆样品 0.5 mL, 置 10 mL 的离心管中, 精密加入内标溶液 (0.10 μg·mL⁻¹ 非诺贝特的甲醇溶液)

50 μL , 涡旋混匀 30 s, 再加乙酸乙酯-甲基叔丁基醚 (1 : 1) 4 mL, 涡旋 3 min, 900 \times g 离心 10 min, 分取上清液 3.5 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下以氮气流吹干, 残留物加甲醇-水 (95 : 5) 0.15 mL 涡旋溶解, 16 000 \times g 离心 10 min, 取上清液 20 μL 进行 LC-MS/MS 分析。按标准曲线法根据峰面积比计算血浆样品中丹参酮 II_A 和隐丹参酮的浓度。

三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ 的提取 精密吸取血浆样品 0.5 mL, 置 10 mL 的离心管中, 精密加入内标溶液 (1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 黄芪甲苷的甲醇溶液) 50 μL , 涡旋混匀 30 s, 加丙酮-甲醇 (4 : 1) 混合溶剂 2.5 mL, 沉淀蛋白, 涡旋 3 min, 900 \times g 离心 10 min, 分取上清液 2.5 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中以氮气流吹干, 残留物加甲醇-水 (50 : 50) 溶剂 0.15 mL 溶解, 涡旋混匀 2 min 后, 16 000 \times g 离心 10 min, 取上清液 20 μL 进行 LC-MS/MS 分析。按标准曲线法根据峰面积比计算血浆样品中三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁ 的浓度。

血浆样品分析方法

丹参素的测定 Inertsil ODS-3 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 0.5% 冰醋酸 (A) - 0.5% 冰醋酸甲醇溶液 (B) 线性梯度洗脱: 0 (60% A - 40% B) \rightarrow 0.5 min (60% A - 40% B) \rightarrow 2 min (0% A - 100% B) \rightarrow 7 min (0% A - 100% B) \rightarrow 7.1 min (60% A - 40% B) \rightarrow 8.5 min (60% A - 40% B), 流速 1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$, 7 : 3 分流后进行质谱检测。电喷雾负离子化, 喷雾电压 4 kV, 毛细管温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 雾化气压 310 kPa, 辅助气压力 34 kPa; 选择性反应检测 (MRM), 碰撞气氦气压力 0.21 Pa, 碰撞能量 20 eV, 检测的离子反应丹参素为 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ m/z 197.0@20 eV \rightarrow m/z 135.0, 吡喹啉 (内标) 为 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ m/z 356.0@20 eV \rightarrow m/z 297.0。

丹参酮 II_A 和隐丹参酮的测定 Inertsil ODS-3 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇-水 (95 : 5) 流动相, 流速 1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ 。大气压化学正离子化, 电晕放电电流 10 μA , 蒸发温度 400 $^{\circ}\text{C}$, 鞘气压 83 kPa, 毛细管温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 选择性反应检测, 碰撞气氦气压力 0.17 Pa, 碰撞能量 25 eV, 检测的离子反应丹参酮 II_A 为 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ m/z 295.1@25 eV \rightarrow m/z 249.1; 隐丹参酮为 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ m/z 297.1@25 eV \rightarrow m/z 251.0; 非诺贝特 (内标) 为 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ m/z 361.0@25 eV \rightarrow m/z 233.0。

三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁ 的测定 Inertsil ODS-3 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 0.1% 甲酸甲醇溶液 (B) 流动

相线性梯度洗脱: 0 (50% A - 50% B) \rightarrow 1.0 min (0% A - 100% B) \rightarrow 4.5 min (0% A - 100% B) \rightarrow 4.6 min (50% A - 50% B) \rightarrow 6.5 min (50% A - 50% B), 流速为 1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$, 7 : 3 分流后进行质谱检测。电喷雾正离子化, 喷雾电压 5 kV, 雾化气压 241 kPa, 辅助气压力 34 kPa, 毛细管温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 选择性反应检测, 碰撞气氦气压力 0.21 Pa, 检测的离子三七皂苷 R₁ 为 $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ m/z 955.3@45 eV \rightarrow m/z 775.5, 人参皂苷 Rg₁ 为 $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ m/z 823.2@45 eV \rightarrow m/z 643.3, 人参皂苷 Rb₁ 为 $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ m/z 1131.5@53 eV \rightarrow m/z 365.1, 黄芪甲苷 (内标) 为 $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$ m/z 807.2@53 eV \rightarrow m/z 627.4。

血浆样品分析方法的验证 由于本实验待测成分丹参素、丹参酮 II_A、隐丹参酮、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁ 的结构及化学性质差异较大, 难以同时进行测定。因此, 分别研究建立了丹参素、丹参酮 II_A 与隐丹参酮^[10]、以及皂苷成分的 LC-MS/MS 测定法, 并分别进行了专属性、线性范围、回收率、基质效应、精密度、准确度及稳定性考察。结果均符合血浆样品分析方法学验证的要求。

数据处理 采用 BAPP 2.0 软件以统计矩法求算药代动力学参数, 并对所得的药代动力学参数进行统计分析。 C_{max} 、 $\text{AUC}_{0-\tau}$ 、 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 采用经自然对数转换后的双因素方差分析; t_{max} 、 $t_{1/2}$ 、MRT、 CL_z/F 和 V_z/F 采用非参数检验 (Wilcoxon 符号秩检验) 进行比较。

结果

1 LC-MS/MS 法测定的典型色谱图

液质联用测定的色谱图分别见图 1~图 3。

2 单味和配伍给药时丹参活性成分的药代动力学

比格犬分别灌胃给药丹参和丹参-三七配伍混悬液后, 血浆中丹参素、丹参酮 II_A 和隐丹参酮的平均血药浓度-时间曲线分别如图 4, 相应的主要药代动力学参数见表 2。

与丹参单味给药相比, 丹参-三七配伍给药后, 丹参素的 C_{max} 显著减少, $t_{1/2}$ 缩短, 清除速率加快, AUC 减少 44%。由此可见, 配伍显著影响丹参素在体内的药代动力学行为, 吸收程度降低, 体内的清除率加快, 从而使其在血液中的浓度降低, AUC 减小。

配伍给药后丹参酮 II_A 和隐丹参酮的药代动力学参数与丹参单味给药相比未见明显变化, 这与丹参的二萜醌类成分的极性较小、首过效应明显、代谢行为与酚酸类和皂苷类成分相差较大相对应^[11, 12]。

3 单味和配伍给药时三七活性成分的药代动力学

比格犬灌胃给药三七和丹参-三七配伍灌胃液后, 血浆中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 和人参皂苷 R_{b_1} 的平均血药浓度-时间曲线分别如图 5 所示, 主要药代动力学参数见表 3。

与单味三七给药相比, 丹参-三七配伍给药后, 3 个皂苷成分的药动学行为均有显著变化: 3 个皂苷成

分的 AUC 均显著降低。三七皂苷 R_1 的 C_{max} 显著减小, CL_z/F 增大; 人参皂苷 R_{g_1} 的 CL_z/F 增大; 而人参皂苷 R_{b_1} 的 C_{max} 显著减小, T_{max} 延后, CL_z/F 未见明显变化。从配伍前后 3 个皂苷成分的药动学参数变化可知, 配伍给药后, 三七皂苷 R_1 在体内的吸收程度减小, 消除速率加快, 从而 AUC 降低; 配伍导致人参皂苷 R_{g_1} 的消除速率加快从而使 AUC 降低; 对于人参皂

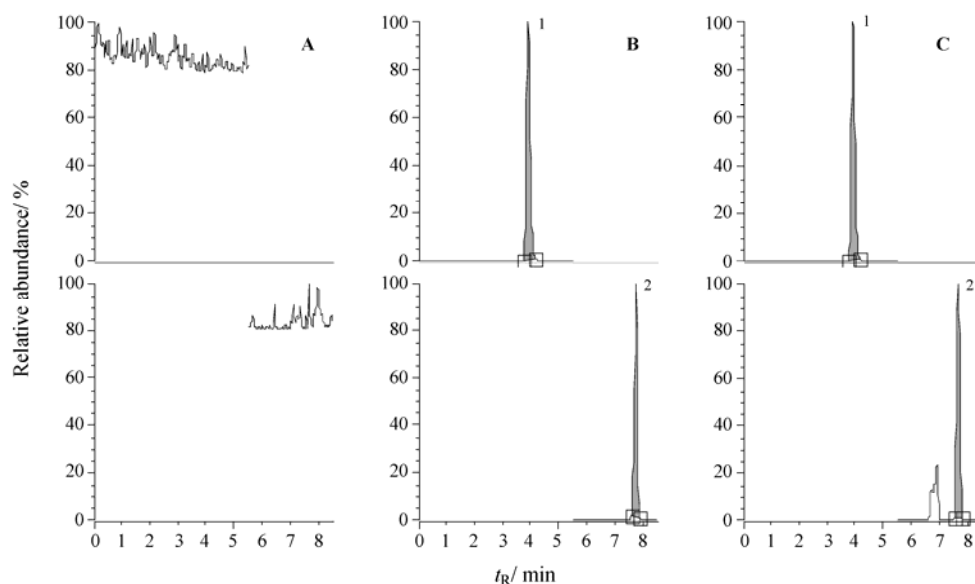


Figure 1 Typical MRM chromatograms for danshensu analysis of blank plasma sample (A), blank plasma sample spiked with danshensu and indometacin (B) and plasma sample obtained 1 h after oral administration of Danshen Sanqi combination suspension (C). 1: Danshensu; 2: Indometacin

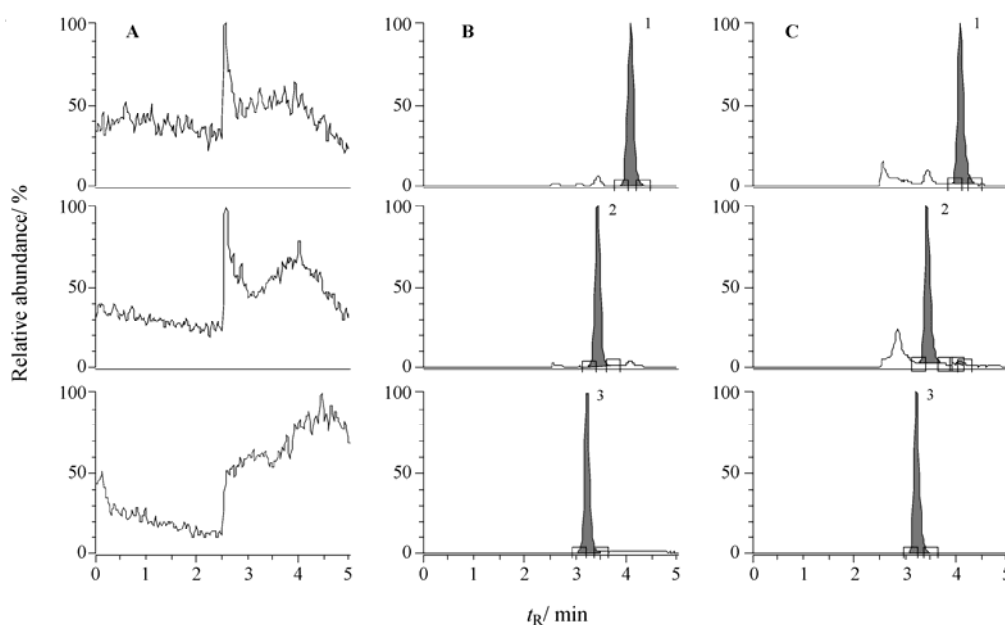


Figure 2 Typical MRM chromatograms for tanshinone II_A and cryptotanshinone analysis of blank plasma sample (A), blank plasma sample spiked with tanshinone II_A , cryptotanshinone and fenofibrate (B), and plasma sample obtained 1 h after oral administration of Danshen Sanqi combination suspension (C). 1: Tanshinone II_A ; 2: Cryptotanshinone; 3: Fenofibrate

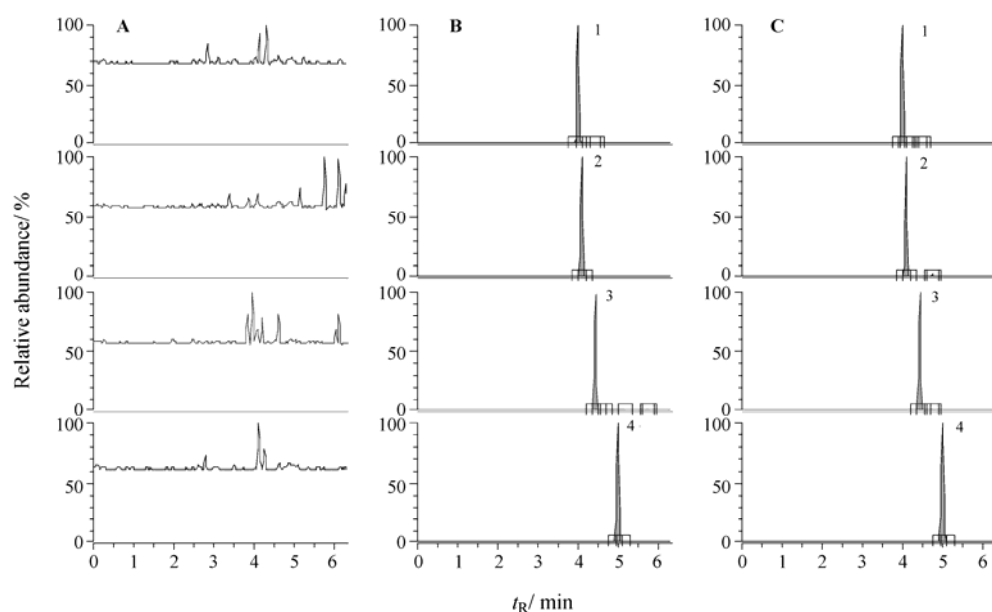


Figure 3 Typical MRM chromatograms for notoginsenoside R1, ginsenoside Rg1 and Rb1 analysis of blank plasma sample (A), blank plasma sample spiked with notoginsenoside R1, ginsenoside Rg1, Rb1 and astragaloside A (B), and plasma sample obtained 3 h after oral administration of Danshen Sanqi combination suspension (C). 1: Notoginsenoside R1; 2: Ginsenoside Rg1; 3: Ginsenoside Rb1; 4: Astragaloside A

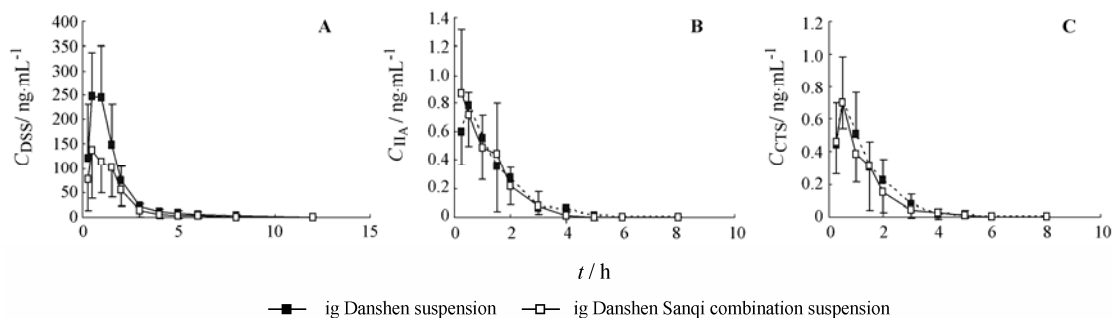


Figure 4 Mean plasma concentration-time profiles of danshensu (A), tanshinone II_A (B) and cryptotanshinone (C) in Beagle dogs after oral administration of Danshen and Danshen Sanqi combination suspensions. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$

Table 2 Pharmacokinetic parameters of danshensu, tanshinone II_A and cryptotanshinone after oral administration of Danshen and Danshen Sanqi combination suspensions in Beagle dogs. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs Danshen suspension group

Parameter	Danshen			Danshen Sanqi combination		
	Danshensu	Tanshinone II _A	Cryptotanshinone	Danshensu	Tanshinone II _A	Cryptotanshinone
$C_{max} / \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	284 ± 89	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.3	$190 \pm 57^*$	1.0 ± 0.3	0.7 ± 0.2
t_{max} / h	0.63 ± 0.23	0.43 ± 0.12	0.57 ± 0.19	0.69 ± 0.44	0.50 ± 0.46	0.64 ± 0.38
$t_{1/2} / \text{h}$	2.07 ± 1.56	0.73 ± 0.50	0.78 ± 0.28	$0.86 \pm 0.58^*$	0.82 ± 0.26	0.81 ± 0.54
MRT / h	1.40 ± 0.25	1.12 ± 0.41	1.13 ± 0.26	1.23 ± 0.37	0.98 ± 0.35	1.02 ± 0.39
$AUC_{0-t} / \text{h} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	422 ± 171	1.2 ± 0.6	1.0 ± 0.5	$235 \pm 107^*$	1.1 ± 0.5	0.9 ± 0.4
$AUC_{0-\infty} / \text{h} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	442 ± 181	1.3 ± 0.6	1.1 ± 0.5	$256 \pm 111^*$	1.3 ± 0.6	1.0 ± 0.4
$CL_z / F / \text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.53 ± 0.16	204 ± 164	229 ± 105	$0.98 \pm 0.43^*$	172 ± 75	240 ± 84
$V_z / F / \text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	1.36 ± 0.93	150 ± 74	245 ± 130	1.09 ± 0.87	194 ± 82	261 ± 154

苷 Rb₁, 配伍则主要通过显著降低其在体内的吸收速率和程度, 使 AUC 显著降低。文献^[13]报道, 皂苷成分口服进入体内后, 大部分在肠道菌群的作用下水解生成其代谢产物, 仅有小部分能进入体内循环, 因

此配伍导致皂苷成分血药浓度的降低可能由于配伍给药使肠道菌群代谢活性出现了变化或者抑制了皂苷成分在胃肠道的吸收, 但也不能排除配伍影响了皂苷成分在体内各组织的分布。而皂苷成分的消除

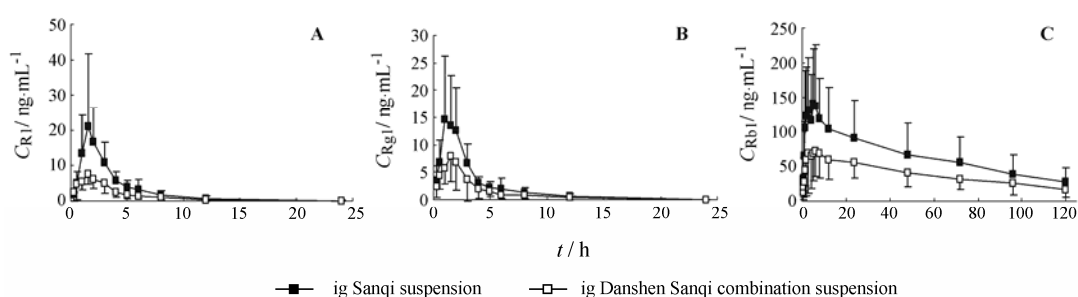


Figure 5 Mean plasma concentration-time profiles of notoginsenoside R1 (A), ginsenoside Rg1 (B) and Rb1 (C) in Beagle dogs after oral administration of Sanqi and Danshen Sanqi combination suspensions. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$

Table 3 Pharmacokinetic parameters of notoginsenoside R1, ginsenoside Rg1 and Rb1 after oral administration of Sanqi and Danshen Sanqi combination suspensions in dogs. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Sanqi suspension group

Parameter	Sanqi			Danshen Sanqi combination		
	Notoginsenoside R ₁	Ginsenoside Rg ₁	Ginsenoside Rb ₁	Notoginsenoside R ₁	Ginsenoside Rg ₁	Ginsenoside Rb ₁
C_{max} /ng·mL ⁻¹	23.3 ± 19.7	18.3 ± 11.4	180.8 ± 87.0	9.0 ± 3.5*	9.8 ± 4.9	88.3 ± 53.5**
t_{max} /h	1.63 ± 0.35	1.50 ± 0.50	5.31 ± 3.45	1.69 ± 0.70	1.36 ± 0.63	8.88 ± 6.69*
$t_{1/2}$ /h	2.76 ± 0.77	5.27 ± 3.37	47.05 ± 13.40	3.47 ± 2.36	4.30 ± 2.53	56.19 ± 22.50
MRT /h	4.06 ± 1.17	3.64 ± 1.27	43.74 ± 4.70	3.62 ± 1.22	3.60 ± 1.10	46.48 ± 3.05
AUC _{0-τ} /h·ng·mL ⁻¹	69.3 ± 36.4	49.6 ± 20.4	7 793 ± 4 846	29.3 ± 10.1*	28.0 ± 17.1*	4 646 ± 2 191*
AUC _{0-∞} /h·ng·mL ⁻¹	70.0 ± 36.0	51.6 ± 18.2	9 874 ± 6 458	31.8 ± 12.1*	29.6 ± 17.9*	6 445 ± 4 509*
CL _z /F /L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	8.96 ± 5.83	39.4 ± 18.3	0.35 ± 0.30	17.32 ± 9.63*	84.6 ± 56.6*	0.41 ± 0.21
V_z/F /L·kg ⁻¹	35.3 ± 27.5	343 ± 361	20.8 ± 15.2	78.6 ± 50.8*	415 ± 244	30.0 ± 12.8*

速率的变化则提示配伍增强了皂苷成分在体内的代谢、消除。

讨论

中药复方成分复杂,其配伍机制的研究应从多成分多角度来开展。本课题主要从药代动力学的角度分析丹参-三七配伍对其中的6个特征活性成分药代动力学行为的影响。由于它们含量低,并且存在较强的首过效应或肠道菌群的水解作用,口服生物利用度均较低^[11, 14],因此,各成分体内药物浓度测定难度高。本文采用高选择性和高灵敏度的LC-MS/MS法为复方丹参方中活性成分的药代动力学配伍研究提供了可能。但是6个成分的化学性质和色谱行为差异极大,丹参素极性极强,丹参酮II_A和隐丹参酮极性弱,三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁和人参皂苷Rb₁则为达玛烷型的四环三萜类皂苷既含极性大的糖苷又有弱极性苷元。为达到最高的测定灵敏度,分别针对这3类成分建立了LC-MS/MS测定方法并进行了验证。

血浆样品的处理方法也经过了优化,尽量分离和消除内源性杂质干扰,降低基质效应,提高回收率和检测灵敏度。经过试验和方法学比较,确定丹参素采用盐酸酸化的乙酸乙酯液-液萃取法处理血浆;丹参酮II_A和隐丹参酮采用乙酸乙酯-甲基叔丁基醚

(50:50)的液-液萃取法处理血浆;而3个皂苷成分则是采用丙酮-甲醇(4:1)的蛋白沉淀法预处理。结果,丹参素的LOQ为2 ng·mL⁻¹,丹参酮II_A、隐丹参酮和3个皂苷成分的LOQ均约为0.1 ng·mL⁻¹,灵敏度显著优于文献^[8, 15]方法。

动物药代动力学实验的给药剂量根据临床用量换算确定。参考中国药典2010版^[1],复方丹参片处方中丹参与三七药材的配比约为3:1。丹参片处方量为丹参药材1.0 g/片,常用剂量为3~4片/次;三七片处方量为三七药材0.5 g/片,常用剂量则为2~6片/次。根据比格犬的平均体重为10 kg计算,确定丹参和三七配伍给药剂量为丹参片3片、三七片2片。由于制剂对药代动力学行为的影响不容忽视,本实验均制成混悬液的形式灌胃给药。

采用三周期自身对照试验设计,目的是缩短实验时程并减少动物数。虽然不能避免周期间以及前期用药对后期药物代谢行为可能存在的影响,在清洗期足够的情况下这种影响通常均不显著;王广基等^[16]的研究也表明即使与丹参联合用药,作为代谢酶CYP1A2底物的茶碱的药代动力学行为也未受到影响。当然,在扩大受试动物数量并采用三周期交叉试验设计时,实验结果可更准确地反映药物配伍对所含活性成分药代动力学行为的影响,完全排除不

同给药周期对实验结果的干扰。

比格犬灌胃给药后的药代动力学结果表明, 丹参-三七配伍对于丹参素和 3 个皂苷成分的药代动力学行为有较大影响。但是, 这并不一定意味着中药配伍后整体药效的下降, 已有文献^[17]报道人参皂苷 Rb₁ 对于心肌细胞长时程增强的活性在 5 nmol 时出现最大值; 人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ 均在浓度为 40 μg·mL⁻¹ 时有最强的神经保护作用, 而在更高剂量时无作用甚至出现反作用^[18]。所以, 皂苷成分的药理活性与剂量存在非线性关系。丹参-三七配伍作为经典的药对, 其活血化瘀的疗效优于单味药。对于丹参酚酸类成分丹参素和三七皂苷成分而言, 配伍是否通过增加其在体内靶器官的分布从而提高其疗效, 而血药浓度因此有所降低, 有待于药效学和组织分布的进一步研究。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2010, 1: 904-907.
- [2] Wei YJ, Qi LW, Li P, et al. Improved quality control method for Fufang Danshen preparations through simultaneous determination of phenolic acids, saponins and diterpenoid quinones by HPLC coupled with diode array and evaporative light scattering detectors [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 45: 775-784.
- [3] Ng TB. Pharmacological activity of sanchi ginseng (*Panax notoginseng*) [J]. J Pharm Pharmacol, 2006, 58: 1007-1019.
- [4] Wu L, Qiao H, Li Y, et al. Cardioprotective effects of the combined use of puerarin and Danshensu on acute ischemic myocardial injury in rats [J]. Phytother Res, 2007, 21: 751-756.
- [5] Jang SI, Jeong SI, Kim KJ, et al. Tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* inhibits inducible nitric oxide synthase expression and production of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 in activated RAW 264.7 cells [J]. Planta Med, 2003, 69: 1057-1059.
- [6] Liu H, Yang J, Du F, et al. Absorption and disposition of ginsenosides after oral administration of *Panax notoginseng* extract to rats [J]. Drug Metab Dispos, 2009, 37: 2290-2298.
- [7] Song M, Hang TJ, Zhang ZX. Pharmacokinetic interactions between the main components in the extracts of *Salvia miltiorrhiza* Bge. in rat [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2007, 42: 301-307.
- [8] Li W, Li ZW, Han JP, et al. Determination and pharmacokinetics of danshensu in rat plasma after oral administration of danshen extract using liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2008, 33: 9-16.
- [9] Cao J, Wei YJ, Qi LW, et al. Determination of fifteen bioactive components in Radix et Rhizoma *Salviae Miltiorrhizae* by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection [J]. Biomed Chromatogr, 2008, 22: 164-172.
- [10] Song M, Hang TJ, Zhang ZX, et al. Determination of cryptotanshinone and its metabolite in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005, 827: 205-209.
- [11] Zhang J, Huang M, Guan S, et al. A mechanistic study of the intestinal absorption of cryptotanshinone, the major active constituent of *Salvia miltiorrhiza* [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 317: 1285-1294.
- [12] Qiu F, Zhang R, Sun J, et al. Inhibitory effects of seven components of danshen extract on catalytic activity of cytochrome P450 enzyme in human liver microsomes [J]. Drug Metab Dispos, 2008, 36: 1308-1314.
- [13] Odani T, Tanizawa H, Takino Y. Studies on the absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. IV. Decomposition of ginsenoside-Rg1 and -Rb1 in the digestive tract of rats [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1983, 31: 3691-3697.
- [14] Li X, Wang G, Sun J, et al. Pharmacokinetic and absolute bioavailability study of total panax notoginsenoside, a typical multiple constituent traditional Chinese medicine (TCM) in rats [J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30: 847-851.
- [15] Deng GF, Wang DL, Meng MX, et al. Simultaneous determination of notoginsenoside R1, ginsenoside Rg1, Re, Rb1 and icariin in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009, 877: 2113-2122.
- [16] Qiu F, Wang G, Zhao Y, et al. Effect of danshen extract on pharmacokinetics of theophylline in healthy volunteers [J]. Br J Clin Pharmacol, 2008, 65: 270-274.
- [17] Abe K, Cho SI, Kitagawa I, et al. Differential effects of ginsenoside Rb1 and malonylginsenoside Rb1 on long-term potentiation in the dentate gyrus of rats [J]. Brain Res, 1994, 649: 7-11.
- [18] Liao B, Newmark H, Zhou R. Neuroprotective effects of ginseng total saponin and ginsenosides Rb1 and Rg1 on spinal cord neurons *in vitro* [J]. Exp Neurol, 2002, 173: 224-234.