

# 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 C<sub>18</sub>(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<sup>-1</sup> 检测波长 270 nm; 内标为 4-氯联苯。结果 线性范围为 0.05 mg·L<sup>-1</sup> ~ 6.40 mg·L<sup>-1</sup>, 最低检测浓度为 0.05 mg·L<sup>-1</sup>。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、日间精密度的(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 C<sub>18</sub> 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<sup>-1</sup>, 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<sup>-1</sup>. The lowest detectable concentration was 0.05 mg·L<sup>-1</sup>. The recoveries at the concentration of 0.05, 1.60 and 6.40 mg·L<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>, 此外还有用固相萃取-分光光度法<sup>[3]</sup>、薄层色谱-荧光法<sup>[4]</sup>、高效液相色谱法<sup>[5]</sup>和 SFE-CGC 法<sup>[6]</sup>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。

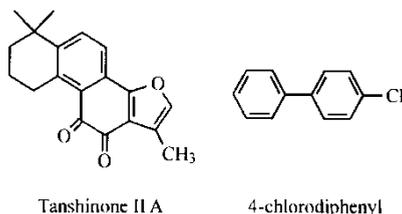
丹参酮 IIA (tanshinone IIA) 和内标 4-氯联苯 (4-chlorodiphenyl) 的结构分别为:

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 C<sub>18</sub> 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<sup>-1</sup>,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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>),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<sup>71</sup>。

## 结果

### 1 色谱行为

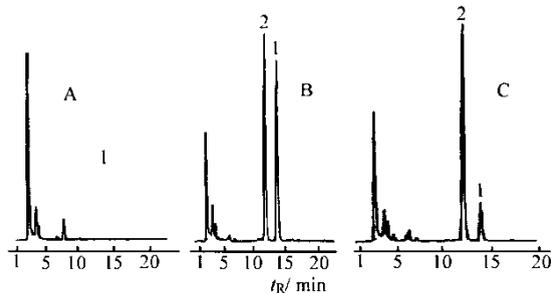
在上述色谱条件下,空白血浆、含药血浆和实测血浆的色谱如图 1 所示,色谱分离良好,不受内源性杂质峰干扰,内标保留时间为 11.68 min,TS 的保留时间为 13.53 min。

### 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<sup>-1</sup> 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  $Y = 0.021\ 64C - 0.000\ 771$ ,  $r = 0.998\ 1$ ,最低定量浓度为 0.05 mg·L<sup>-1</sup>( $S/N = 3$ )。

### 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<sup>-1</sup> 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%( $n = 5$ )。



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

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

### 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<sup>81</sup>。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<sup>-1</sup>,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。

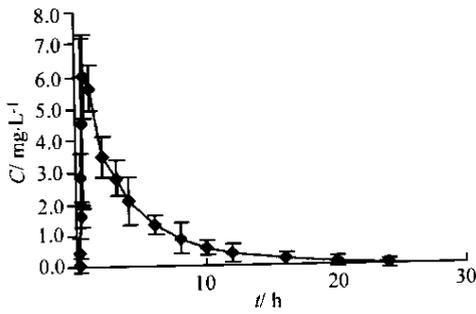


Figure 2 Mean plasma concentration-time curve of tanshinone IIA after single oral dose of  $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  in rats

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  $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  in rats**

Parameter	Values	Standard error (SE)
$A / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	30.82	$2.57\text{E} + 01$
$B / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	3.87	$1.80\text{E} + 0$
$\alpha / \text{h}^{-1}$	1.27	$3.18\text{E} - 01$
$\beta / \text{h}^{-1}$	0.19	$7.99\text{E} - 02$
$T_{1/2\alpha} / \text{h}$	0.55	
$T_{1/2\beta} / \text{h}$	3.63	
$T_{1/2ka} / \text{h}$	0.41	
$k_a / \text{h}^{-1}$	1.69	$3.17\text{E} - 01$
$T_{\text{max}} / \text{h}$	0.85	
$C_{\text{max}} / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	5.57	
$V_d / \text{mL}$	1.34	
$\text{AUC} / \text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	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。

由药动力学参数可知, 大鼠  $ig$  丹参酮 IIA 后, 吸收相半衰期为  $0.55 \text{ h}$ , 消除相半衰期为  $3.63 \text{ h}$  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 Medico-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.