

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.22.009

丹参冻干粉针对大鼠体内硝苯地平药动学的影响*

张 华^{1,2,3}, 邱 镇^{1,2}, 陈 红^{1,2}, 陈卫东^{1,2△}

(1. 安徽中医药大学, 合肥 230012; 2. 安徽省中医药科学院/中药资源保护与开发研究所, 合肥 230012; 3. 马鞍山十七冶医院, 安徽马鞍山 243000)

[摘要] **目的** 研究丹参冻干粉针对大鼠体内硝苯地平药动学的影响。**方法** 将 24 只健康大鼠(雌雄各半)分成低、中、高丹参冻干粉针组(20、40、80 mg/kg)和空白对照组(生理盐水),连续 7 d 尾静脉注射灌服 10 mg/kg 硝苯地平,给药后 0.05、0.083、0.167、0.25、0.5、0.75、1、2、4、8、12、24 h 由大鼠眼眶取血,采用高效液相色谱(HPLC)法测定血浆硝苯地平浓度,采用 DAS2.0 计算药动学参数。**结果** 与单独灌服硝苯地平相比,大鼠连续 7 d 尾静脉注射 20、40、80 mg/kg 丹参冻干粉针,硝苯地平的平均驻留时间[MRT(0→∞)]分别增加 51.6%($P<0.05$)、102.3%($P<0.05$)和 73.3%($P<0.01$)。**结论** 丹参冻干粉针可减慢硝苯地平的体内消除,排泄减慢,而对其他药动学参数没有影响。

[关键词] 丹参冻干粉针;硝苯地平片;高效液相色谱;药动学**[中图分类号]** R927.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)22-2917-04

Effect of Salvia Miltiorrhiza Lyophilized Powder Injection on in vivo nifedipine pharmacokinetics in rats*

ZHANG Hua^{1,2,3}, QIU Zhen^{1,2}, CHEN Hong^{1,2}, CHEN Weidong^{1,2△}

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230012, China; 2. Anhui Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine/Traditional Chinese Medicine Resources Protection and Development, Hefei, Anhui 230012, China; 3. Maanshan Seventeenth Metallurgy Hospital, Maanshan, Anhui 243000, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of Salvia Miltiorrhiza Lyophilized Powder Injection on in vivo nifedipine pharmacokinetics in rats. **Methods** Twenty-four healthy rats (half male and half female) were divided into the low, medium and high doses Salvia Miltiorrhiza Lyophilized Powder Injection groups (20, 40, 80 mg/kg) and blank control group (physiological saline). After 7 d tail vein injection, 10 mg/kg nifedipine was given to rats by gavage. Then the eye canthus blood was taken from rats at 0.05, 0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h. The plasma nifedipine concentration was detected by HPLC. The pharmacokinetic parameters were calculated by adopting DAS2.0. **Results** Compared with the nifedipine gavage alone, after the rat tail vein injection of Salvia Miltiorrhiza Lyophilized Powder Injection (20, 40, 80 mg/kg) for 7 d, nifedipine MRT(0→∞) was increased by 51.6% ($P<0.05$), 102.3% ($P<0.05$) and 73.3% ($P<0.01$) respectively. **Conclusion** Salvia Miltiorrhiza Lyophilized Powder Injection can slow down the in vivo elimination of nifedipine, and slows down its excretion, and has no effects on other pharmacokinetic parameters.

[Key words] Salvia Miltiorrhiza Lyophilized Powder Injection; nifedipine tablets; HPLC; pharmacokinetics

高血压作为临床常见慢性疾病之一,是引起心脑血管疾病的一个主要因素。我国高血压发病率明显上升,成为世界上高血压危害最严重的国家^[1]。硝苯地平是一类长效钙通道阻滞剂,对血压控制效果良好,是高血压患者临床治疗的首选药物之一^[2-3]。丹参是唇形科植物丹参的干燥根和根茎,最初记载于

《神农本草经》,被列为上品。现代药理学研究表明,丹参具有扩张冠状动脉、防止心肌缺血和心肌梗死、改善微循环、降低心肌耗氧量等作用,在临床上,广泛用于心脑血管疾病的治疗^[4-5]。另外丹参粉具有消除氧自由基、提高一氧化氮(NO)合成释放、提高纤溶活性的作用,可改善患者病情,减少靶器官损害及并发

* 基金项目:安徽省重点研究与开发计划项目(1704a0802145);安徽省教育厅基金项目(2016hz23);安徽省科技专项资金项目(13Z04013)。

作者简介:张华(1983—),主管药师,硕士在读,主要从事中药药物代谢动力学方面的研究。△ 通信作者,E-mail:anzhongdong@126.com。

症的发生^[6]。但二者联合使用在心血管疾病的治疗中是否能产生有益的影响,或者说二者之间有无协同作用,国内尚无相关研究报道。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 24 只健康 SD 大鼠[由安徽医科大学实验动物中心提供;清洁级,合格证号为 SCXK(皖)2011-002],体质量(220±10)g。饲养条件:温度为(20±2)℃,湿度为(50±5)%,每天 12 h 光照。适应性饲养 2 周,自由饮食,进水。实验前禁食 12 h,自由饮水。

1.2 仪器与试剂 LC-15C 高效液相色谱仪(日本岛津),AB135-S 型十万分之一电子天平(德国梅特勒-托利多仪器有限公司),XW-80A 微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司),KQ-300B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),TG16-WS 台式高速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司),LC-4016 型低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司),BCD-225CHC 冰箱(合肥美菱股份有限公司)。硝苯地平对照品购自中国食品药品检定研究院(纯度大于 99.9%,批号 100338-201103),地西洋对照品购自西安万昌生物科技有限公司(纯度大于 99%,批号 D-104140403)。硝苯地平片购自南京白敬宇制药有限责任公司(批号 151101;每片 10 mg),丹参冻干粉针剂购自哈药集团中药二厂(批号 1601768;400 mg/支)。甲醇购自上海信可有限公司(色谱纯),超纯水为安徽中医药大学自制(18.2 Ω)。

1.3 方 法

1.3.1 色谱条件 色谱柱 COSMOSIL C18 柱(4.6×250 mm,5 mm),检测波长 235 nm。流动相(B)甲醇-(A)水(55:45,V/V),在线脱气,等度洗脱。流速为 1.0 mL/min,柱温箱设置温度为 30℃,进样定量环为 20 μL。

1.3.2 给药方案及血浆样品采集 按体质量分成 4 组,每组 6 只。从实验第 1 天到第 6 天对 4 组分别进行不同的给药预处理。对照组:尾静脉注射生理盐水;丹参粉针低剂量组:尾静脉注射 20 mg/kg 丹参粉针;丹参粉针中剂量组:尾静脉注射 40 mg/kg 丹参粉针;丹参粉针高剂量组:尾静脉注射 80 mg/kg 丹参粉针。末次给药后,禁食 12 h,自由饮水。实验第 7 天,各组大鼠按上述剂量给药后,立即灌服硝苯地平 10 mg/kg。于给药后 0.05、0.083、0.167、0.25、0.5、0.75、1、2、4、8、12、24 h 由大鼠眼眶取血 0.3 mL,立即置于肝素化 EP 管中,摇匀,3 500 r/min 离心 10 min 以分离血浆,-20℃保存,备测。

1.3.3 血浆样品处理 精密移取大鼠血浆 90 μL,将

其置于 1.5 mL 具塞离心管中,加入 10 μL 内标地西洋(浓度为 7.76 μg/mL,用甲醇溶解),再精密加入 300 μL 甲醇(蛋白沉淀剂),置涡旋混合仪上涡旋振荡 3 min,混匀后,置于低速离心机中 3 500 r/min 离心 10 min,取全部上清液,过 0.22 μm 微孔滤膜,取上清液进样分析。采用内标法,目标峰与内标峰面积的比值进行定量分析。

2 结 果

2.1 专属性考察 取大鼠的供试品、对照品及内标溶液分别按照“1.3.1”项下色谱条件进样分析,用来考察内标地西洋以及血浆的内源性杂质是否干扰硝苯地平的测定。结果表明,硝苯地平的保留时间为 16.7 min,内标地西洋的保留时间为 7 min,各色谱峰峰形较好,色谱峰分离度良好,且空白血浆中的内源性杂质及内标地西洋在此条件下没有干扰硝苯地平的测定。供试品中硝苯地平与对照品中的硝苯地平的保留时间相同,说明该条件特异性较强,方法专属性较高。

2.2 标准曲线与线性范围 精密吸取不同浓度的硝苯地平标准品溶液,加入内标和空白血浆,配制含硝苯地平 0.8、1.6、3.2、6.4、12.8、25.6、51.2 μg/mL 的血浆标准溶液,按“1.3.3”项下方法处理样品,以血药浓度(p)为横坐标,硝苯地平与内标的峰面积比值(Y)为纵坐标,建立回归方程,求得硝苯地平的回归方程为 $Y=0.0836X+0.0736$, $R^2=0.9988$,所得结果表明硝苯地平线性范围为 0.8~51.2 μg/mL,且线性关系良好,定量下限(LLOQ)为 0.8 g/mL。标准曲线见图 1。

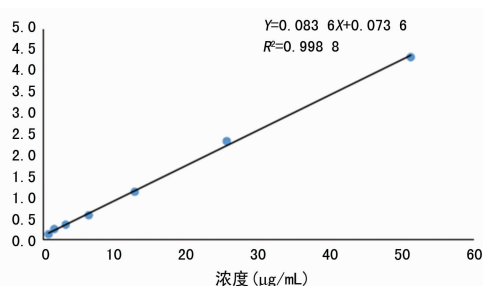


图 1 血浆中硝苯地平的回归曲线($n=7$)

2.3 精密度与回收率 精取硝苯地平对照液(0.8、1.6、6.4 和 38.0 μg/mL),配制成 LLOQ、低、中、高 4 个浓度的质控样本溶液,分别按照“1.3.3”方法进样分析。每个浓度平行 6 个样本,连续测定 3 d(每天重新配制样品),计算日内和日间精密度(表 1)。

2.4 稳定性 按“1.3.3”项下方法配制 LLOQ、低中高(0.8、1.6、6.4 和 38.0 μg/mL)4 个质量浓度的硝苯地平血浆样品,考察血样在室温条件下于 0、2、4、8、12、24 h 内放置的稳定性。另外还考察放置于-20

℃ 冰箱冻存, 先后两次将血浆样品取出的血浆样品稳定性。各条件下每一浓度平行 6 份, 经测定各浓度的 RSD 值均小于 10%。说明上述条件下各血浆样品稳定性良好。

2.5 药动学参数分析

2.5.1 血药浓度-时间曲线 根据所得的血药浓度数据结果, 绘制各组血药浓度-时间曲线; 使用 DAS 2.0 软件对所测得各血药浓度数据进行拟合, 其参数结果如图 2 所示。

2.5.2 统计矩参数 从药时曲线结果可知, 联合使用的中剂量组曲线上的点均大于对照组的浓度, 且丹参冻干粉针剂对大鼠体内硝苯地平的血药浓度是增加的。从上表可以看出低剂量、中剂量、高剂量实验组的平均驻留时间[MRT(0→∞)]分别为 685.363±

192.728、799.976±394.869、599.533±127.471, 各实验组均明显大于对照组, 差异有统计学意义(P<0.05; P<0.01), 见表 2。

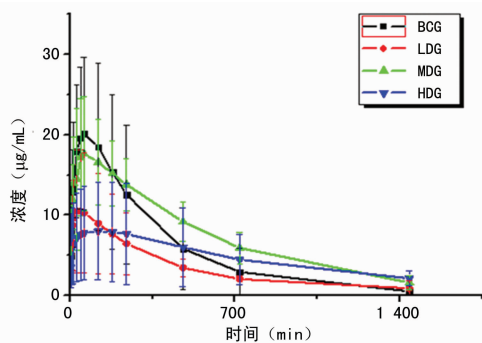


图 2 药时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表 1 精密度结果 (n=6)

标示浓度 (µg/mL)	日内		日间	
	平均值 ($\bar{x} \pm s$)	RSD (%)	平均值 ($\bar{x} \pm s$)	RSD (%)
0.8	0.813±0.020	2.44	0.803±0.153	19.10
1.6	1.579±0.070	4.45	1.611±0.173	10.76
6.4	6.406±0.825	12.88	6.383±0.468	7.33
38.0	37.825±0.567	1.50	38.482±3.612	9.39

表 2 大鼠的统计矩参数 ($\bar{x} \pm s$)

参数	高剂量组	中剂量组	低剂量组	对照组
AUC(0-t) (mg·L ⁻¹ ·min ⁻¹)	9 347.993±4 090.449	13 397.988±2 761.008	7 774.134±1 420.049	10 497.988±7 190.001
MRT(0-t) (min)	461.941±73.7	459.238±59.077	395.761±57.971	310.677±65.106
MRT(0→∞) (min)	685.363±192.728*	799.976±394.869*	599.533±127.471*	395.371±89.083
t _{1/2z} (min)	309.622±90.83	465.592±371.749	331.210±154.785	267.001±114.054
CL _z (L·min ⁻¹ ·kg ⁻¹)	1.279±0.773	0.676±0.174	1.235±0.308	1.228±0.605
V _z (L/kg)	548.203±315.084	419.055±260.344	572.597±247.222	435.181±245.213

* : P<0.05; ** : P<0.01, 与对照组比较

3 讨论

根据药典可知, 硝苯地平为疏水性成分, 甲醇、乙腈是蛋白沉淀法常用的有机溶剂, 用甲醇的优点是上清液澄清, 沉淀为絮状且易于分离, 血浆杂质峰少, 重现性好^[7-9], 故选用操作简便、对操作者伤害小、成本较低、适合于大批量生物样品处理的蛋白沉淀法对血浆生物样品进行前处理^[10-11]。

本实验采用常用的流动相甲醇-水, 并以甲醇-水(55:45)作为使用比例, 根据文献^[12-14]流动相甲醇-水(60:40)的参考, 又因甲醇-水(50:50)冲洗柱子出峰时间快, 但黏度大、避免使用, 综合考虑样品出峰时间和安全性问题, 最终确定以甲醇-水(55:45)比例制备流动相。

根据内标物选择的要求, 因为地西洋具有镇静、抗焦虑和一定的抗心律失常作用, 能有效改善硝苯地平体位性低血压的不良反^[15], 结合样品出峰时间的考虑, 地西洋出峰时间较早, 总分析时间仅 7 min, 优化了整体出峰时间, 本实验确定用地西洋作为内标物质。

通过硝苯地平联合丹参冻干粉针用药的实验组(丹参低剂量组、临床等效量组、高剂量组)与对照组对比, 发现实验组 MRT(0→∞)数值均高于生理盐水组, 表明丹参可以增加硝苯地平在体内的平均驻留时间。MRT 是药物在体内的平均驻留时间, 静脉推注一定量药物后, 药物分子分布于全身各处, 这些药物分子于体内滞留时间不等^[16]。平均驻留时间是一个

总体行为的特征,它是每一个分子滞留时间的平均值,也是非常重要的药动学参数^[17]。本实验联合丹参冻干粉针剂使用的实验组的 MRT(0→∞)均较对照组有显著增加,可能减慢硝苯地平的体内消除,对硝苯地平的代谢可能具有一定的抑制作用。

通过实验组 t1/2z 数值的比较,发现高剂量组 t1/2z 数值明显低于中、低剂量组,可能是过高浓度的丹参溶液会诱导硝苯地平在体内的代谢。后期可能还需要从能够影响硝苯地平体内消除过程的其他代谢酶或转运蛋白角度设计进一步的实验,以期可以阐明丹参冻干粉针剂对大鼠体内硝苯地平消除过程产生影响的机制。

本实验建立了灵敏检测大鼠体内硝苯地平的血浆生物样品分析方法——HPLC 法,该方法符合生物样品分析要求。在实验中实验方法的确立、样品的处理、试剂与样品的稳定性实验等操作,体现了实验的严谨、消除了存放时间、贮存温度对实验结论的影响。

本实验以不同剂量丹参冻干粉针剂对硝苯地平影响,所得血药浓度作比较,对联合用药时丹参冻干粉针剂对硝苯地平的药动学参数的影响进行了初步研究。在多次给药中建立了连续 7 d 注射不同剂量丹参的 3 个实验组及注射生理盐水的对照组。结果显示在联合使用丹参冻干粉针剂时实验组大鼠体内硝苯地平的滞留时间均有所提高,具体为低、中、高剂量组的 MRT(0→∞)与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$),但实验组其他药动学参数与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。

参考文献

- [1] 隋玉兰,马现文. 高血压患者的药物治疗[J]. 中国现代药物应用,2011,5(1):223-224.
- [2] 刘春娥. 硝苯地平缓释片对微创脑出血术后重度高血压的血压控制及疗效的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志,2016,19(15):99-101.
- [3] 高俊岭,丁永明,傅华. 社区高血压病人 5 种常见降压药物的评价[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2017,15(20):2592-2594.
- [4] 赵娜,郭治昕,赵雪,等. 丹参的化学成分与药理作用[J]. 国外医药(植物药分册),2007,22(4):155-160.
- [5] 张伯礼,高秀梅,商洪才. 复方丹参方的药效物质及作用机理研究[J]. 世界科学技术·中医药现代化,2003,5(5):14-17.
- [6] 李艳玲,施志雄. 丹参(冻干)粉治疗高血压病效果观察及护理[J]. 广西医学,2011,33(6):763-765.
- [7] 李健,包随平. 氨氯地平阿托伐他汀钙片治疗高血压合并冠心病的临床价值观察[J]. 世界临床医学,2016,10(2):99-99.
- [8] 潘英文,汤玉蓉. 氨氯地平阿托伐他汀钙片治疗高血压合并冠心病护理观察[J]. 中国现代药物应用,2013,7(23):204-205.
- [9] 吕美春. 门诊患者抗高血压药物联用情况分析[J]. 现代医药卫生,2011,27(2):254-255.
- [10] 刘海燕,张云杰,张楠楠,等. 高效液相色谱法研究注射液加替沙星在家兔体内的药代动力学[J]. 黑龙江医药科学,2008,31(3):32-34.
- [11] 张宁,范广俊,吕慧怡,等. 高效液相色谱法测定硝苯地平阿替洛尔复方缓释片的血药浓度[J]. 中国药物与临床,2005,5(9):700-701.
- [12] 陈东,朱碧君. HPLC 法测定硝苯地平片含量的方法学研究[J]. 中国临床药理学与治疗学,2002,7(6):555-556.
- [13] 叶肖栗,叶伟峰,张继业. HPLC 法测定补阳还五汤中主要成分及其代谢研究[J]. 药物分析杂志,2016,36(5):765-775.
- [14] 杨小林,邱栋梁,尚庆霞. HPLC 梯度洗脱法测定硝苯地平氢氯噻嗪片中两组分的含量[J]. 海峡药学,2015,27(8):57-58.
- [15] 戎亚雄,王旭刚,吴斌. 硝苯地平地西洋联合治疗顽固性肾绞痛[J]. 江苏大学学报(医学版),2003,13(2):154-155.
- [16] 李新刚,赵志刚. 药物在中心室平均滞留时间的计算方法[J]. 中国药学杂志,2014,49(15):1364-1368.
- [17] 高晓彦,陈济民. 药物代谢动力学的平均滞留时间(Mean Residence Time MRT)的新概念以及体内代谢物 MRT 的简便计算方法[J]. 沈阳药学院学报,1989,6(4):308-310.

(收稿日期:2018-01-20 修回日期:2018-05-22)