

丹参酮 II_A 自微乳制剂在大鼠体内血药浓度测定

张亚军¹, 李江英², 崔延堂¹(1.西北大学生命科学学院, 西安 710069; 2.西安市中医医院, 西安 710001)

摘要: 目的 建立大鼠血浆中丹参酮 II_A 浓度的测定方法, 考察丹参酮 II_A 自微乳制剂的药动学特征。方法 采用乙腈沉淀蛋白进行血浆预处理, 以 HPLC 测定给药后大鼠血浆中丹参酮 II_A 的浓度。色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), 流动相为乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 枸橼酸水溶液(80:20), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长: 270 nm, 柱温 25 °C。比较丹参酮 II_A 自微乳制剂组和混悬液组大鼠血药浓度曲线的差异。结果 丹参酮 II_A 在 0.102~8.2 mg·L⁻¹ 内线性关系良好($r=0.9986$), 绝对回收率为 77.5%~85.6%, 相对回收率为 88.3%~96.8%, 日内和日间精密性 RSD 均小于 15%。丹参酮 II_A 自微乳制剂比丹参酮 II_A 混悬液的 AUC 值高约 2.5 倍。结论 本法可以准确、灵敏地测定大鼠血浆中丹参酮 II_A 的浓度。将丹参酮 II_A 制成自微乳制剂, 能提高其生物利用度。

关键词: 丹参酮 II_A; 自微乳; 血药浓度

中图分类号: R969.11

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)05-0384-03

Determination of Tanshinone II_A in the Self-Microemulsifying Preparation in Rat Plasma

ZHANG Yajun¹, LI Jiangying², CUI Yantang¹(1.Northwest University, Xi'an 710069, China; 2.Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the determination of tanshinone II_A in rat plasma and investigate pharmacokinetic characteristics of tanshinone II_A self-microemulsifying preparation (TSP). **METHODS** Protein precipitation method with acetonitrile was applied to purify plasma samples before analysis. The concentration of tanshinone II_A in rat plasma was detected by HPLC using Kromasil C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm). The mobile phase was consisted of acetonitrile and 0.01 mol·L⁻¹ citric acid solution(80:20). The flow rate was 1 mL·min⁻¹ and the column temperature was 25 °C. The detection wavelength was 270 nm. The pharmacokinetic profiles of tanshinone II_A between self-emulsifying and suspension were compared by oral administration. **RESULTS** The standard curve was linear over the range of 0.102~8.2 mg·L⁻¹ ($r=0.9986$). The absolute recovery was 77.5% to 85.6%, and the assay recovery was 88.3% to 96.8%. The intra- and inter-day precision RSD were less than 15%. The AUC after TSP administration was approximately 2.5-fold compared with that of the suspension. **CONCLUSION** The method is accurate and sensitive for the determination of tanshinone II_A in rat plasma. Bioavailability of tanshinone II_A was improved by self-microemulsifying.

KEY WORDS: tanshinone II_A; self-microemulsion; plasma concentration

口服给药是临床用药的主要形式。许多疏水性强的药物, 由于溶出是其吸收的限速步骤, 往往呈现较低的生物利用度。自微乳化药物传递系统(self-microemulsifying drug delivery systems, SMEDDS)在胃肠道内自发形成微乳, 药物溶解于

油/水型微乳中, 从而增加药物的溶解性, 增强药物的吸收, 提高难溶性药物的口服生物利用度, 成为国内外药剂学研究的热点之一^[1]。

丹参酮 II_A 是中药丹参脂溶性成分之一, 具有抗菌消炎、扩张血管、抗动脉粥样硬化、抗血

基金项目: 陕西省教育厅专项科研项目(08JK478)

作者简介: 张亚军, 男, 博士, 讲师 Tel: (029)88302707

E-mail: zviliv@163.com

小板聚集、抗自由基等作用。但其水溶性差,生物利用度低,直接影响了临床疗效^[2]。本试验制备丹参酮II_A自微乳化体系,通过给药后大鼠血药浓度测定,研究自微乳释药模式对丹参酮II_A体内行为的影响,为进一步开展丹参酮II_A高生物利用度制剂的开发研究提供依据。

1 材料

1.1 仪器

HPLC系统:天美LC-2130输液泵,天美LC-2030紫外检测器;TGL-16B高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);FA1004N电子天平(上海医科大学仪器厂);XW80-2涡旋混合器(上海医科大学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

丹参酮II_A原料(西安华阳生物科技有限公司,批号:071026,纯度>97%);中链脂肪酸甘油酯(铁岭北亚药用油脂有限公司);聚氧乙烯化蓖麻油(Cremophor RH40,德国BASF公司);无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司);肝素注射剂(河北常山生化药业有限公司,规格:每支2 mL:1.25万IU);丹参酮II_A混悬液(丹参酮II_A研成细粉,加入0.5%羧甲基纤维素钠溶液,搅拌均匀即得,浓度2 g·L⁻¹);丹参酮II_A对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110766-200417,纯度>98%);甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他化学试剂均为分析纯。

1.3 动物

清洁级SD大鼠10只,♂,体重(250±20)g,由西安交通大学实验动物中心提供,实验动物合格证号:医动字第08-005号。

2 方法和结果

2.1 丹参酮II_A自微乳制剂的制备

精密称取处方量中链脂肪酸甘油酯(15%)、聚氧乙烯化蓖麻油(65%)和无水乙醇(20%),于37℃恒温水浴温 and 搅拌混合均匀,加入丹参酮II_A继续搅拌直至形成透明红色油状液体,即为含丹参酮II_A 2.0 mg·g⁻¹的SMEDDS。

2.2 丹参酮II_A大鼠血浆测定方法学的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm);流动相:乙腈-0.01 mol·L⁻¹枸橼酸水溶液(80:20);流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:270 nm;柱温:25℃。进样量20 μL。

2.2.2 血浆样品采集及处理 大鼠禁食不禁水12 h后,灌胃给予丹参酮II_A SMEDDS和丹参酮II_A混悬液(相当于丹参酮II_A 4 mg·kg⁻¹),分别于给药前和给药后0.3, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6 h于眼底静脉丛取血0.3 mL,置肝素处理的Eppendorf管中,5 000 r·min⁻¹离心10 min,分离血浆,取0.1 mL,置-20℃冰箱保存。用前融化,加入乙腈200 μL涡旋混匀,离心10 min(12 000 r·min⁻¹),取上清20 μL进样分析。

2.2.3 专属性考察 取空白血浆、灌胃后血浆各0.1 mL;另取1份空白血浆,加入丹参酮II_A对照品溶液50 μL,配制浓度为0.512 mg·L⁻¹对照品血浆。按“2.2.2”项下方法进行处理,进样,所得色谱图,见图1。结果表明,在本实验条件下,丹参酮II_A色谱峰峰形好,柱效高,血浆中杂质峰和代谢物峰不干扰样品的测定,基线噪音小,丹参酮II_A的出峰时间为8.65 min。本方法专属性良好。

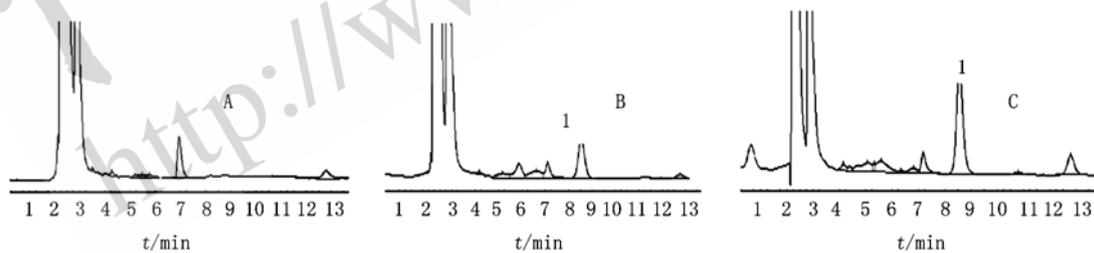


图1 高效液相色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆加入丹参酮II_A; C-血浆样品; 1-丹参酮II_A

Fig 1 HPLC chromatograms

A-blank plasma; B-blank plasma with tanshinone II_A; C-plasma sample; 1-tanshinone II_A

2.2.4 丹参酮II_A标准曲线的绘制 ①对照溶液的配制:精密称取丹参酮II_A对照品9.84 mg,用甲醇溶解,制成49.2 mg·L⁻¹丹参酮II_A对照品储备液。用甲醇稀释储备液,配成0.615, 1.538, 3.075,

6.15, 12.3, 24.6, 49.2 mg·L⁻¹对照品系列溶液。

②标准曲线的制备:取大鼠空白血浆0.1 mL,精密加入不同浓度的对照品溶液50 μL,使其分别含丹参酮II_A: 0.102, 0.256, 0.512, 1.025, 2.05, 4.1,

8.2 mg·L⁻¹；按“2.2.2”项下方法操作，进样分析。以浓度(X)对峰面积(Y)作直线回归，得回归方程： $Y=115.2X-2.1$ ， $r=0.9986$ 。结果表明丹参酮II_A在0.102~8.2 mg·L⁻¹内线性良好。

2.2.5 回收率与精密度试验 取空白血浆0.1 mL，分别加入浓度为1.23, 12.3, 24.6 mg·L⁻¹丹参酮II_A对照品溶液50 μL，制备丹参酮II_A的质控(QC)样品，用随行标准曲线测定QC样品浓度，每个浓度5个样本，连续测定3 d，计算日内、日间精密度和相对回收率，结果见表1。另取超纯水0.1 mL，加入不同浓度丹参酮II_A对照品溶液，使其质量浓度与QC样品相同，按“2.2.2”项下操作，从而求得血浆中丹参酮II_A绝对回收率，结果见表1。结果表明，本方法的回收率与精密度良好，可以用于丹参酮II_A的血药浓度测定。

表1 回收率和精密度试验结果(n=5)

理论浓度/mg·L ⁻¹	绝对回收率		相对回收率		精密度, RSD/%	
	平均值/%	RSD/%	平均值/%	RSD/%	日内	日间
0.205	77.5	7.4	90.29	7.9	10.6	8.6
2.05	82.7	6.6	88.3	4.2	5.4	6.8
4.1	85.6	4.4	96.8	2.8	5.8	7.2

2.2.6 定量限和检测限 按信噪比S/N=3，确定丹参酮II_A的检测限为15.2 μg·L⁻¹；按S/N=10，确定其定量限为51.6 μg·L⁻¹(RSD=11.2%，n=5)。

2.2.7 稳定性考察 将丹参酮II_A对照品储备液置冰箱4℃存放，加入丹参酮II_A对照品的大鼠血浆置冰箱-20℃和室温分别存放，定期取样测定，以考察药物的稳定性。结果对照品储备液在4℃冰箱中保存7 d稳定；血浆样品在-20℃冰箱中保存15 d基本稳定，在室温下放置12 h基本稳定。另将低、中、高3个浓度(0.205, 2.05, 4.1 mg·L⁻¹)的对照品血浆样品各3份，-20℃冰箱冷冻24 h，取出待完全融化后，按“2.2.2”项下方法处理并进样分析，反复冻融3次，与未冻融前相比求得浓度的偏差分别为6.1%，4.2%，3.6%，表明血样反复冻融不影响其稳定性^[3]。

2.3 大鼠灌胃给予丹参酮II_ASMEDDS和丹参酮II_A混悬液后血药浓度测定

10只SD大鼠，5只灌胃给予丹参酮II_ASMEDDS，5只给予丹参酮II_A混悬液，取血，按“2.2.2”项下方法处理，进样分析。二者丹参酮II_A的血药浓度-时间曲线见图2。用矩量法求得丹参酮II_A药动学参数。结果表明，大鼠灌胃给药丹

参酮II_A混悬液后， t_{max} 为(0.72±0.2)h， $AUC_{(0-t)}$ 为(1.21±0.5)mg·h·L⁻¹， $AUC_{(0-∞)}$ 为(1.5±0.4)mg·h·L⁻¹；而大鼠灌胃给药丹参酮II_ASMEDDS， t_{max} 为(0.45±0.43)h， $AUC_{(0-t)}$ 为(2.88±0.8)mg·h·L⁻¹， $AUC_{(0-∞)}$ 为(3.43±0.9)mg·h·L⁻¹。

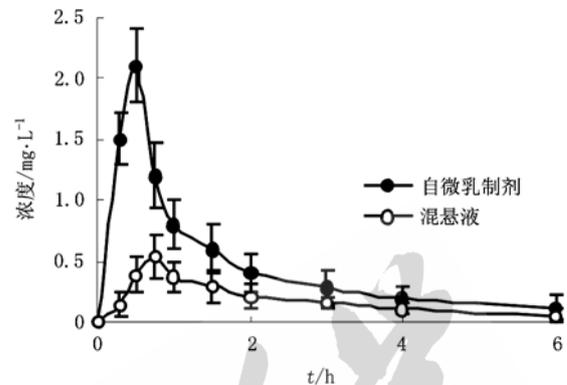


图2 平均血药浓度-时间曲线(n=5)

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve (n=5)

3 讨论

自乳化释药系统是由油相、乳化剂、助乳化剂组成的固体或液体制剂。进入机体后在胃肠蠕动下自发形成微乳，于胃肠道均匀、快速分布；而乳化剂的表面活性能降低表面张力，使药物易于通过胃肠壁水化层，直接和胃肠上皮细胞接触，且增加了肠道上皮细胞的流动性，促进药物吸收。此外，SMEDDS也可经淋巴管吸收克服首过效应，一定程度上避免药物在胃肠道内被酶水解，有助于提高生物利用度^[4]。本研究中丹参酮II_ASMEDDS比丹参酮II_A混悬液体的AUC高约2.5倍，达峰时间也有所提前，可见SMEDDS可以改善丹参酮II_A吸收，提高其生物利用度，是一种很有前景的给药载体系统。

REFERENCES

- [1] SHEN X, WU W. Self-emulsifying and self-microemulsifying drug delivery systems [J]. J Fudan Univ Med Sci(复旦学报医学版), 2003, 30(2): 180-183.
- [2] LI H L, ZHANG Z Y, MA L L, et al. Preparation of tanshinone microemulsion and its absorption in rat intestine in situ [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2007, 32(11): 1024-1027.
- [3] ZOU J H, ZHAO C J, DAI X W. RP-HPLC determination of indapamide concentration in human plasma [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2007, 27(1): 69-72.
- [4] KOMMURU T R, GURLEY B, KHAN M A, et al. Self-emulsifying drug delivery systems(SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment [J]. Int J Pharm, 2001, 212(1): 233-246.

收稿日期: 2009-09-21