

丹参酮 II A 对酸浆苦素 D 在大鼠体内药动学特性的影响

张彦焘¹, 沈旭², 郑运亮^{2*} (1. 广州卫生职业技术学院, 广州 510450; 2. 浙江大学医学院附属第一医院, 杭州 310003)

摘要: 目的 研究丹参酮 II A 对酸浆苦素 D 在大鼠体内药动学特性的影响。方法 12 只 SD 大鼠随机分为对照组和丹参酮 II A 组, 分别灌胃生理盐水与丹参酮 II A, 丹参酮 II A (50 mg·kg⁻¹, 每天 1 次) 连续给药 3 d 后, 酸浆苦素 D 灌胃给药后按时间点连续采样, 采用 HPLC-MS/MS 测定酸浆苦素 D 在大鼠血浆中的含量, 采用 WinNolin 6.3 软件计算主要药动学参数, 2 组间药动学参数采用 SPSS 11.0 统计软件对药动学参数进行 *t* 检验。结果 对照组和丹参酮 II A 组酸浆苦素 D 的药动学参数间差异存在显著性差异 ($P < 0.05$), 连续给药丹参酮 II A 3 d 后给酸浆苦素 D, 酸浆苦素 D 的 AUC_{0-24 h} 及 C_{max} 均有显著提高。结论 丹参酮 II A 能够显著影响酸浆苦素 D 在大鼠体内药动学过程。

关键词: 丹参酮 II A; 酸浆苦素 D; 药动学; 羧酸酯酶; 相互作用; 液质联用

中图分类号: R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2019)20-2518-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.20.005

引用本文: 张彦焘, 沈旭, 郑运亮. 丹参酮 II A 对酸浆苦素 D 在大鼠体内药动学特性的影响[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(20): 2518-2521.

Effect of Tanshinone II A on Pharmacokinetic Characteristics of Physalin D in Rats

ZHANG Yantao¹, SHEN Xu², ZHENG Yunliang^{2*} (1. Guangzhou Health Science College, Guangzhou 510450, China; 2. First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of carboxylesterase inhibitor (tanshinone II A) on pharmacokinetic characteristics physalin D in rats. **METHODS** Twelve SD rats were randomly divided into the control group and tanshinone II A group, which was administrated respectively with normal saline and tanshinone II A. After pretreated with tanshinone II A (50 mg·kg⁻¹, qd) for 3 d, physalin D was given to the rats by intragastric administration. The plasma concentrations of physalin D were determined by HPLC-MS/MS. The main pharmacokinetic parameters were calculated by WinNonlin 6.3 software, pharmacokinetic parameters between two groups were then compared with *t* test by SPSS 11.0 software. **RESULTS** There had significant differences between the two groups in the main pharmacokinetic parameters of physalin D ($P < 0.05$). AUC_{0-24 h} and C_{max} of oxymatrine D were significantly increased after continuous administration of tanshinone II A for 3 d. **CONCLUSION** Ginsenone II A can significantly influence the pharmacokinetic process of physalin D in rats.

KEYWORDS: tanshinone II A; physalin D; pharmacokinetic; carboxylesterase; interaction; LC-MS/MS

酸浆苦素是存在于酸浆属 (*Physalis*) 植物 (如锦灯笼、小酸浆、苦蕒等) 及其他相近茄科植物中的一类高氧化水平的 13,14-裂环-16,24-环麦角甾烷类化合物 (C₂₈H₃₀₋₃₄O₉₋₁₂)。酸浆苦素 D 是酸浆苦素中的高含量、高活性成分, 药理研究表明, 酸浆苦素 D 在体外对白血病、乳腺癌、结肠癌等多种肿瘤细胞的生长均具有较好抑制作用^[1]; 此外, 酸浆苦素还具有调节免疫、抗疟疾和抗菌等药理活性^[2]。文献以酸浆苦素 D 为对象的报道均显示该化合物具有较大的药用价值。但本课题组前期将酸浆苦素 D 分别灌胃和尾静脉注射给 SD 大鼠, 对该化合物在大鼠体内的生物利用度进行初步考察, 结果表明该化合物在大鼠体内的绝对生物利

用度仅为 1.34%^[3-4]。因此, 如何提高酸浆苦素 D 的体内生物利用度成为其进一步开发过程中亟待解决的难题。

羧酸酯酶属于 α/β 折叠水解酶家族, 肝、肾、小肠组织及血液中均有分布, 在水存在的条件下能够水解代谢带羧基的酯, 羧酸酯酶又被确定为代谢活化前药过程中的一个关键性酶, 可起到抑制药物和活化前药的作用^[5]。内酯类结构是酸浆苦素类成分的特征性结构域, 但是此类化合物较低的生物利用度是否与羧酸酯酶的水解作用相关, 尚未见报道。本研究拟用羧酸酯酶抑制剂-丹参酮 II A 作为探针药物^[6], 探索羧酸酯酶对酸浆苦素 D 在大鼠体内药动学特征的影响, 为提高此类化合

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LY19H280011)

作者简介: 张彦焘, 男, 硕士, 讲师 Tel: 13535302109 E-mail: 893696212@qq.com *通信作者: 郑运亮, 男, 博士, 助理研究员 Tel: (0571)87236560 E-mail: ylzhang1984@zju.edu.cn

物的生物利用度, 促进其进一步开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

LC20AD 液相色谱仪(日本岛津); API 4000 三重四级杆质谱、Analyst[®] software 工作站 V1.6.3(美国应用生物系统公司); Waters XBridge[™]-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm); Eppendorf 移液器、Eppendorf Centrifuge 5417R 高速离心机(德国 Abbott 公司); XW-80A 漩涡混合器(上海医科大学仪器厂); Milli Q[®]超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

1.2 药物

乙腈为色谱纯(德国 Merck 公司); 氮气(>99.9%, NG1000 氮气发生器, 上海析维生物医药科技有限公司); 酸浆苦素 D 和酸浆苦素 H(内标)由笔者所在实验室从锦灯笼药材中提取纯化得到(纯度>96.0%; HPLC 峰面积归一化法测得, 结构见图 1), 经结构鉴定, 其 ¹H-NMR、¹³C-NMR 谱图与文献[7-8]报道一致; 丹参酮 II A 购自萨恩化学技术(上海)有限公司(CAS: 568-72-9, 批号: 20171009; 纯度: 97.0%)。

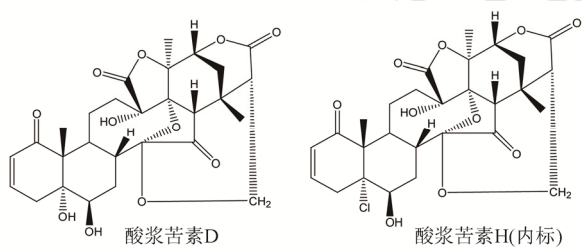


图 1 酸浆苦素 D 和酸浆苦素 H(内标)的化学结构图

Fig. 1 Chemical structure of physalin D and physalin H(IS)

1.3 动物

12 只 SD 大鼠, ♂, 体质量(180±25)g。实验大鼠购自浙江省实验动物中心, 许可证号: SYXK(浙)2019-0012, 动物实验符合动物伦理委员会相关标准。给药前动物适应性饲养 24 h, 禁食不禁水。

2 方法

2.1 色谱、质谱条件

色谱柱: Water XBridge[™]-C₁₈(4.6 mm×150 mm, 3.5 μm); 流动相: 0.1%的甲酸水溶液-乙腈(45:55); 流速: 0.6 mL·min⁻¹, 等度洗脱; 柱温箱温度 30 °C; 进样室温度 4 °C, 避光; 进样量为 5 μL。

采用岛津 LC20 液相色谱仪和 API 4000 三重四级杆质谱联用。HPLC 接口为大气压电喷雾离子源(ESI), 正离子检测模式; 干燥气温度为 500 °C; 喷雾电压为 5 000 V; 气帘气为 25 psi; 碰撞气为 10 psi; 离子源气体(GS1、GS2)为 50 psi。扫描方式为多重反应选择离子监测模式(multi reaction monitoring, MRM)(负离子), 定量分析的离子对(*m/z*)信息和主要质谱参数见表 1。

表 1 酸浆苦素 D 和酸浆苦素 H 定量分析的离子对(*m/z*)信息和主要质谱参数

Tab. 1 Quantitative analysis of ion pair information and main mass spectrometry parameters of physalin D and physalin H

化合物名称	质谱参数				
	母离子	子离子	去簇电压/V	碰撞能量/V	碰撞室出口电压/V
酸浆苦素 D	545.1	509.1	110	28	12
酸浆苦素 H(内标)	563.1	545.2	95	26	11

2.2 灌胃液的配制

精密称取酸浆苦素 D 100.0 mg, 用羧甲基纤维素钠水溶液(0.5%)混悬并定容, 得 5.0 mg·mL⁻¹的混悬液, 置于 4 °C 冰箱保存, 备用。

精密称取丹参酮 II A 500.0 mg, 用羧甲基纤维素钠水溶液(0.5%)混悬并定容, 得 10.0 mg·mL⁻¹的混悬液, 置于 4 °C 冰箱保存, 备用。

2.3 血浆样品的预处理

取大鼠血浆 50 μL, 加入 5 μL 内标酸浆苦素 H(10.0 μg·mL⁻¹), 加入 200 μL 乙酸乙酯, 涡旋 1 min, 13 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后取乙酸乙酯层于 EP 管, 用氮气吹干, 吹干后的 EP 管用 50 μL 的 50%乙腈水溶液复溶, 再 13 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后取上清 5 μL 进样。

2.4 药动学研究

12 只大鼠随机分为对照组和丹参酮 II A 组, 后者每天灌胃给药丹参酮 II A(50 mg·kg⁻¹, qd)^[9], 对照组则给予相应体积的生理盐水, 共 3 d。禁食 12 h 后于第 4 天, 2 组均进行酸浆苦素 D 混悬液单剂量 20 mg·kg⁻¹ 灌胃给药, 分别于给药前和给药后 5, 10, 20, 40, 60 min, 1.5, 2.5, 4.0, 6.0, 9.0, 12, 24 h 断尾取血约 0.3 mL, 置肝素化塑料离心管(1.5 mL)中, 2 000 ×g 离心 10 min, 取血浆按上述方法处理后进样测定。

2.5 药动学参数

根据药-时曲线, 采用 Phoenix WinNolin 6.3

软件通过非房室模型分析方法计算药动学参数。其中, 峰浓度($C_{\max}$)和达峰时间($t_{\max}$)均为实测值; $AUC_{0-24\text{ h}}$ 按每个时间点的血药浓度以梯形法计算, $C_{24\text{ h}}$ 为最后一点的血药浓度, λ 为末端消除速度常数; λ 用对数血药浓度-时间曲线末端直线部分的斜率求得, $t_{1/2}=0.693/\lambda$ 。

2.6 统计学处理

实验数据和药动学参数以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间采用 SPSS 11.0 统计软件对药动学参数进行 t 检验, 当 $P<0.05$ 时差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 方法验证的结果

本研究参照中国药典 2015 年版第四部附录 9012 的相关要求, 对采用的 LC-MS/MS 进行了详细的方法学验证, 结果表明本方法具有较好的选择性, 色谱图见图 2; 酸浆苦素 D 和内标的系统残留效应均 $<5\%$; 方法的定量下限为 $5.32\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 在 $5.32\sim 2\,130\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内方法线性关系良好; 标准曲线方程为 $Y=0.002\,57X+0.005\,3(R=0.997\,0)$; 方法的日内精密度的 $4.53\%\sim 13.83\%$, 日间精密度的 $6.82\%\sim 14.31\%$, 准确度均为 $86.25\%\sim 113.6\%$; 各质控的提取回收率为 $60.5\%\sim 64.8\%$, 峰面积归一化的基质效应均在 1.0 左右。酸浆苦素 D 在血浆基质以及在处理、存储过程中的稳定性可参考课题组前期研究结果^[3]。

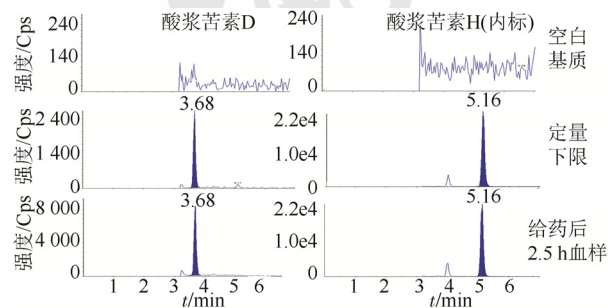


图 2 大鼠血浆中酸浆苦素 D 和酸浆苦素 H(内标)的 LC-MS/MS 色谱图(MRM 监测模式)

Fig. 2 LC-MS/MS chromatograms (in MRM mode) of physalin D and physalin H(IS) obtained from rats' plasma samples

3.2 2 组大鼠的血药浓度-时间曲线

丹参酮 II A 组和对照组大鼠分别采用酸浆苦素 D 单剂量 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给药后, 测定不同时间点酸浆苦素 D 的血药浓度, 血药浓度-时间曲线见图 3。

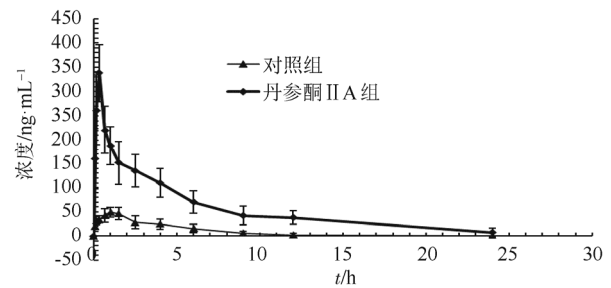


图 3 丹参酮 II A 和对照组大鼠酸浆苦素 D 的血药浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 3 Blood concentration-time curve of physalin D in rats of tanshinone II A group and control group($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.3 2 组大鼠的药动学参数比较

丹参酮 II A 组和对照组大鼠的酸浆苦素 D 主要药动学参数见表 2。统计分析结果显示, 酸浆苦素 D 的主要药动学参数 $C_{\max}$ 和 $AUC_{0-24\text{ h}}$ 差异均有显著的统计学意义($P<0.01$)。

表 2 大鼠中丹参酮 II A 组和对照组的酸浆苦素 D 的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

药动学参数	酸浆苦素 D	
	对照组	丹参酮 II A 组
$C_{\max}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	51.80 ± 13.10	$356.87 \pm 85.52^{1)}$
$T_{\max}/\text{h}$	1.25 ± 0.29	1.00 ± 0.89
$t_{1/2}/\text{h}$	3.11 ± 1.37	6.13 ± 0.49
$AUC_{0-24\text{ h}}/\text{ng}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$	226.5 ± 70.06	$1\,516.4 \pm 377.75^{1)}$

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$.

4 讨论

自 1969 年至今, 从酸浆属植物中共分离得到 50 余个酸浆苦素类化合物, 该类化合物以其独特、新颖的化学结构和较高的生物活性, 已引起药学界的高度关注。以往以酸浆苦素为对象的报道均显示该类化合物具有较大的药用价值, 但到目前为止, 该类化合物的相关研究多局限于分离纯化、体外活性筛选及化学合成等方面, 有关其口服后的吸收、代谢等影响其进一步开发利用的关键信息鲜见报道。

课题组前期对酸浆苦素的代表性成分酸浆苦素 D 在大鼠体内绝对生物利用度的研究表明, 此类化合物的体内生物利用度较低, 仅为 1.34%。据文献报道, 部分酸浆苦素稳定性较差, 容易发生结构转化, 如: 酸浆苦素 A 在适当条件下能够转化生成多种衍生物, 包括 4,7-didehydroneophysalin

B、anhydrophysalin A 和 dehydrophysalin B 等^[10-11]；酸浆苦素 B 等可以在不同光源的诱导或催化条件下发生异构化反应，生成相应的衍生物^[12-13]。笔者所在课题组的前期研究发现 4,7-didehydroneophysalin B 在 50% 的甲醇水溶液中室温放置 24 h 后能够转化生成 anhydrophysalin A、dehydrophysalin B 等衍生物^[14]。前期研究结果充分说明，从化合物在体内代谢转化的角度入手，阐释酸浆苦素类化合物生物利用度低的原因，将有助于解决该类化合物在消化道吸收率低的问题，有利于提高酸浆苦素类化合物的成药性。

哺乳动物羧酸酯酶属于水解酶家族的成员，在各个动物种属间普遍存在^[15]。羧酸酯酶广泛分布于体内多个组织，并以肝脏、小肠和肺等器官中的含量相对较高^[16]。众多药物代谢酶存在于肝脏中，参与内源性和外源性化合物的生物转化。CESs 作为 I 相药物代谢酶，可水解许多含酯键的药物或酯类前药^[17]，笔者所在课题组基于酸浆苦素内酯类结构在体内可能会被羧酸酯酶代谢的假设，设计并实施本研究内容。结果显示，与给丹参酮 II A 前相比，丹参酮 II A 使酸浆苦素 D 在大鼠中的 AUC₀₋₁ 增加近 6.7 倍($n=6$)，具有统计学差异，证明酸浆苦素类化合物确实是羧酸酯酶的底物。本研究可为提高此类化合物的生物利用度，促进其进一步开发利用提供理论依据和实验基础，由于羧酸酯酶有多种亚型(CES1、CES2 等)，至于酸浆苦素 D 是哪种亚型的底物以及其具体的代谢转化产物和转化机制有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] MAGALHÃES H I, VERAS M L, TORRES M R, et al. *In-vitro* and *in-vivo* antitumour activity of physalins B and D from *Physalis angulate* [J]. J Pharm Pharmacol, 2006, 58(2): 235-241.
- [2] LI A L, CHEN B J, LI G H, et al. *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino: An ethnomedical, phytochemical and pharmacological review [J]. J Ethnopharmacol, 2018(210): 260-274.
- [3] WU Y J, ZHENG Y L, CHEN N, et al. Plasma pharmacokinetics and tissue distribution study of physalin D in rats by ultra-pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879(5/6): 443-448.
- [4] ZHENG Y L, CHEN Y, REN Y P, et al. An ultra-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of three physalins in rat plasma and its application to pharmacokinetic study of *Physalis Alkekengi* var. *franchetii* (Chinese lantern) in rats [J]. J Pharm Biomed Anal, 2012(58): 94-101.
- [5] LIAN J H, NELSON R, LEHNER R. Carboxylesterases in lipid metabolism: from mouse to human [J]. Protein Cell, 2018, 9(2): 178-195.
- [6] HATFIELD M J, TSURKAN L G, HYATT J L, et al. Modulation of esterified drug metabolism by tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* ("Danshen") [J]. J Nat Prod, 2013, 76(1): 36-44.
- [7] JANUÁRIO A H, FILHO E R, PIETRO R C, et al. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae) [J]. Phytother Res, 2002, 16(5): 445-448.
- [8] BUNSHO M, MASAO K, TOICHI O, et al. Structural revision of physalin H isolated from *Physalis angulate* [J]. J Nat Prod, 1995, 58(11): 1668-1674.
- [9] YANG L, ZHANG B S, YIN L, et al. Tanshinone II A prevented brain iron dyshomeostasis in cerebral ischemic rats [J]. Cell Physiol Biochem, 2011, 27(1): 23-30.
- [10] TAGA T, MIWA Y, MACHIDA K, KAWAI M, et al. Structure of 4, 7-didehydroneophysalin B, acid-induced rearrangement product of physalin A [J]. Acta Cryst, 1991(C47): 2188-2191.
- [11] MATSUURA T, KAWAI M, NAKASHIMA R, et al. Structures of physalin A and physalin B, 13, 14-seco-16, 24-cyclo-steroids from *Physalis alkekengi* var. *Francheti* [J]. J Chem Soc, 1970(5): 664.
- [12] MAKINO B, KAWAI M S, KITO K, et al. New physalins possessing an additional carbon-carbon bond from *Physalis alkekengi* var. *francheti* [J]. Tetrahedron, 1995, 51(46): 12529-12538.
- [13] MAKINO B, KAWAI M, YAMAMURA H, et al. Tautomerism between exomethylene type physalins and oxymethylene-bridged physalins [J]. Pharmazie, 2002, 57(3): 215-216.
- [14] ZHENG Y L, CHEN Y, REN Y P, et al. Quantitative and transformation product analysis of major active physalins from *Physalis alkekengi* var. *franchetii* (Chinese lantern) using ultraperformance liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry [J]. Phytochem Anal, 2012, 23(4): 337-344.
- [15] ELLINGHAUS P, SEEDORF U, ASSMANN G. Cloning and sequencing of a novel murine liver carboxylesterase cDNA 1 The nucleotide sequence data reported here have been submitted to the EMBL data bank under accession number Y12887.1 [J]. Biochim Et Biophys Acta Bba-Gene Struct Expr, 1998, 1397(2): 175-179.
- [16] SATOH T, TAYLOR P, BOSRON W F, et al. Current progress on esterases: from molecular structure to function [J]. Drug Metab Dispos, 2002, 30(5): 488-493.
- [17] LIU D, ZHANG C L. Carboxylesterase and ester drug metabolism [J]. Her Med(医药导报), 2010, 29(3): 332-335.

收稿日期: 2018-11-15
(本文责编: 李艳芳)