

当归中藁本内酯在大鼠体内的药代动力学研究

杨 岚^{1,2}, 刘佳丽^{1,2}, 郭秉荣^{1,2}, 崔 杰^{1,2}, 秦雪梅¹, 高晓霞^{1*}

¹山西大学中医药现代研究中心; ²山西大学化学化工学院, 太原 030006

摘要:采用超高效液相色谱(UPLC-PDA)法测定大鼠灌胃当归石油醚萃取物后藁本内酯的血药浓度。色谱条件: 色谱柱 BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相: 乙腈-水(0.03% 三氟乙酸)(45:55, v/v); 流速: 0.5 mL/min; 检测波长: 320 nm。并运用 DAS 3.0 药动学软件计算药动学参数, 研究当归石油醚萃取物中藁本内酯在大鼠体内的药代动力学。结果显示藁本内酯在大鼠体内较符合二室模型, 主要的药动参数: 高、中剂量组的 C_{max} 分别为 0.38 ± 0.04、0.33 ± 0.02 (μg/mL); t_{1/2β} 分别为 4.08 ± 0.25、3.06 ± 0.82 (h), 低剂量组含量过低, 无法进行定量。实验结果表明 UPLC-PDA 法能够较准确、灵敏的测定藁本内酯在大鼠体内的血药浓度, 经比较高、中剂量组的药动参数得知, 该物质呈非剂量依赖型。

关键词: 藁本内酯; 当归; 药代动力学; 超高效液相色谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

Pharmacokinetics of Ligustilide in Rats after ig Administration of Petroleum Ether Extract of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels

YANG Lan^{1,2}, LIU Jia-li^{1,2}, GUO Bing-rong^{1,2}, CUI Jie^{1,2}, QIN Xue-mei¹, GAO Xiao-xia^{1*}

¹Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University;

²College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: To investigate the pharmacokinetics of ligustilide in *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels, a specific ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) method was developed and validated for determining the concentration of ligustilide in serum of rats after ig administration of petroleum ether extract of *A. sinensis* (Oliv.) Diels. The chromatographic conditions were as follows: Waters UPLC was equipped with a reversed phase column (BEH C₁₈, 2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm). The mobile phase was a mixture of acetonitrile and 0.03% trifluoroacetic acid in water with the proportion of 45:55 (v/v). The flow rate was 0.5 mL/min. The column temperature was maintained at 40 °C. The UV detection wavelength was set at 320 nm. The main pharmacokinetic parameters of ligustilide were obtained by DAS 3.0 software. The results of compartmental analysis indicated that the kinetic process of ligustilide in rats was best fitted to the two compartments model and the main pharmacokinetic parameters were as follows: C_{max} and t_{1/2β} being 0.38 ± 0.04、0.33 ± 0.02 (μg/mL) and 4.08 ± 0.25、3.06 ± 0.82 (h) in high and middle dosage groups, respectively. The low dosage data was not detected because serum concentration of ligustilide in low dosage group was below limit of quantitation. The results indicated that the UPLC-PDA method developed in this study was accurate, sensitive, and rapid for the determination of ligustilide in rats' serum. The pharmacokinetic characteristic of ligustilide was non-dose-dependent by comparing the parameters of high and middle dosage group.

Key words: ligustilide; *Angelica sinensis*; pharmacokinetic; UPLC

当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 始载于《神农本草经》, 素

有“血家百病此方通”之说, 鉴于该味药作用之广, 近年来对于其物质基础及药理活性的研究颇多, 据文献^[1-3]报道: 当归挥发油具有舒张血管、抗血小板凝集、保护神经等功效, 藁本内酯则是其中主要的起效成分之一^[4]。本课题组前期在研究抗抑郁药逍遥散的物质基础时发现, 逍遥散乙醇提取物经石油醚萃取后所得的萃取物抗抑郁活性较高, 其中藁本

收稿日期: 2013-06-17 接受日期: 2013-12-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(81001688); 国际科技合作项目(2011DFA32630); “重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09103201-035); 山西省基础研究青年科技研究基金项目(2011021007-1); 山西省高等学校中青年拔尖创新人才支持计划

* 通讯作者 Tel: 86-351-7011202; E-mail: gaioxiaxia@sxu.edu.cn

内酯为该复方中当归的主要贡献成分^[5],并且“逍遥散复方药代动力学初探”^[6]与“血清药物化学”的研究结果也表明其在大鼠体内有明显入血,因此明确当归中该成分在大鼠体内的药动学特性势在必得。目前,关于该成分的研究焦点主要集中于药理活性,有关药代动力学的研究却为数不多,仅有的几篇也只以单体或川芎挥发油中该成分作为研究对象^[7,8],而同样作为当归中较为重要的活性成分之一,以当归石油醚萃取物作为给药主体的药动学研究尚未见报道。本文建立了UPLC-PDA方法测定当归石油醚萃取物中藁本内酯血药浓度,并对其大鼠体内的药代动力学进行了研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器

超高效液相色谱仪(ACQUITY UPLC™ PDA,美国 Waters);Sartorius 电子分析天平(德国赛多利斯 SARTORIUS 有限公司);高速冷冻离心机(TGL-6,长沙湘仪离心机有限公司);真空干燥箱(上海跃进医疗器械厂);微量移液器(200 μ L,1 mL,Thermo);氮吹仪装置(实验室自制)。

1.2 药品与试剂

当归购于山西省华阳药业有限公司,经山西大学中医药现代研究中心主任秦雪梅教授鉴定为正品,且留样于山西大学中医药现代研究中心。藁本内酯、内标异欧前胡素对照品(纯度98%)均购自上海顺勃有限公司。

石油醚、95%乙醇、甲醇、乙腈、乙醚和异丙醇均为分析纯,购自北京化工试剂公司;纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司;色谱级甲醇和乙腈购自 Fisher Scientific(USA)。

1.3 实验动物

健康雄性SD大鼠16只,体重 260 ± 20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:SCXK(京2006-0008)。将大鼠置于昼夜节律光照条件下,自由进食进水,饲养7 d适应环境,每日触摸动物以适应实验人员的操作。

2 实验方法

2.1 当归石油醚萃取物的制备

取当归药材适量,加8倍量95%乙醇,回流提取3次,第1、2次每次2 h,第3次1 h,合并回流液,过滤,回收乙醇至无醇味,加水分散,浓缩至浸膏

(棕色粘稠液),加入与浸膏等体积的石油醚,超声提取(每次30 min),至萃取液近乎无色时,合并石油醚萃取液,旋转蒸发,回收溶剂并浓缩至浸膏,于真空干燥箱(60℃)中干燥,即得(出膏率1.36%)。

2.2 对照品溶液的制备

称取藁本内酯对照品约5.00 mg,精密称定,置于10 mL容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀即得藁本内酯0.497 mg/mL的对照品储备液,并经甲醇稀释成不同浓度的系列标准溶液,贮存于-20℃冰箱内,备用。

2.3 灌胃液的制备

当归石油醚萃取物用调和食用油超声溶解制得灌胃液,藁本内酯浓度分别为3.768、1.884、0.942 mg/mL(按藁本内酯含量折算)。

2.4 血清样品的采集

SD大鼠18只,随机分成3组(即低剂量组、中剂量组、高剂量组),每组6只。实验前大鼠禁食12 h,自由饮水。称量大鼠体重,将当归石油醚萃取物灌胃液以10 mL/kg的标准分别对三组灌胃给药,并于给药前及给药后0.083、0.25、0.5、1、1.5、2.5和8 h经眼眶静脉丛取血0.5 mL,静置0.5 h后,4000 rpm离心10 min。移取上清液,-80℃冷藏待用。

2.5 血清样品预处理

精密吸取血清200 μ L,置10 mL EP离心管中,依次加入浓度为1 μ g/mL的内标异欧前胡素50 μ L,甲醇50 μ L,萃取剂正己烷2 mL,涡旋混合3 min,3000 rpm离心10 min,分取上层清液至另一10 mL EP离心管中,下层残渣再加正己烷2 mL萃取,合并两次萃取液,常温下N₂流吹干,残渣加入100 μ L甲醇超声溶解3 min,涡旋混合2 min后,转移至0.5 mL EP离心管中,于13000 rpm离心5 min,取上清液,自动进样分析。

2.6 色谱条件

色谱柱:BEH C₁₈(2.1 mm × 100 mm,1.7 μ m);流动相:乙腈-水(0.03%三氟乙酸)(45:55,v/v);流速:0.5 mL/min;柱温:40℃;进样量:5 μ L;检测波长:320 nm。

3 实验结果

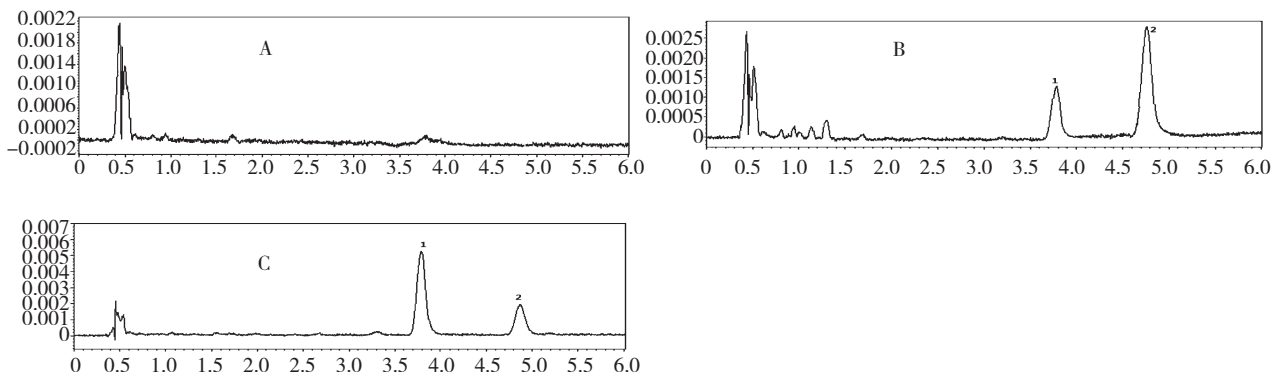
3.1 方法学考察

3.1.1 专属性

取空白血清、空白血清加对照品、受试大鼠灌胃当归石油醚萃取物0.25 h后的血清样品按“2.5”项处

理,进样分析。所得代表色谱图,见图1。结果表明,血浆样品中藁本内酯与内标异欧前胡素的保留时间分别为3.7和4.9 min。经过比较显示血清中

的内源性物质对内标和待测物质均无干扰,专属性良好。



1:藁本内酯 2:异欧前胡素

1: Ligustilide 2: Isoimperatorin

图1 空白血清(A)、空白血清加对照品(B)及大鼠灌胃当归石油醚萃取物0.25 h后血清样品(C)的UPLC色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of blank serum (A), blank serum spiked with ligustilide and isoimperatorin standards (B) and serum sample after ig administration of petroleum ether extract of *A. Sinensis* at 0.25 h (C)

3.1.2 标准曲线与定量下限

空白血清200 μL ,分别加入50 μL 内标溶液和50 μL 标准系列溶液,配制成含藁本内酯浓度为9.144、4.572、1.828、0.914、0.457、0.183、0.091 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的血清样品,按“血清样品预处理”项下方法操作并测定,记录色谱图。以藁本内酯峰面积与内标物峰面积之比(Y)对藁本内酯质量浓度(X)进行加权最小二乘法线性回归,所得回归方程为: $Y = 1.161X - 0.021$ ($r^2 = 0.9981$),线性范围:0.091 ~ 9.144 $\mu\text{g}/\text{mL}$,线性良好。血清中药物的最低检测

浓度(LLOQ)为0.091 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.1.3 精密度与准确度

取空白血清200 μL ,按照“标准曲线与定量下限”项下方法,分别制备藁本内酯高、中、低3个浓度(浓度分别为7.315、0.914、0.183 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的藁本内酯血清质控(QC)样本,并测定高、中、低浓度的日内精密度与准确度;同法连续测定3 d,计算日间RSD与RE。数据均以“ $\bar{X} \pm SD$ ”表示,结果符合方法学要求,高、中、低浓度的日内和日间RSD值与RE值均 $< 10\%$,见表1。

表1 测定方法的精密度与准确度($n = 6$)

Table 1 Precision and accuracy of the developed UPLC method ($n = 6$)

加入量 Nominal concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	日内 Intra-day			日间 Inter-day		
	测得量 Detected concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	精密度 Precision RSD (%)	准确度 Accuracy RE (%)	测得量 Detected concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	精密度 Precision RSD (%)	准确度 Accuracy RE (%)
0.183	0.177 \pm 0.013	7.3	3.3	0.174 \pm 0.014	8.1	4.5
0.914	0.932 \pm 0.085	9.2	-2.0	0.878 \pm 0.076	8.7	3.9
7.315	7.088 \pm 0.432	6.1	3.1	7.586 \pm 0.599	7.9	-3.7

3.1.4 回收率实验

取空白血清200 μL ,按照“标准曲线与定量下限”项下方法,分别制备藁本内酯高、中、低3个浓度(浓度分别为7.315、0.914、0.183 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的藁本内酯QC样品各6份。按“2.5 血清样品预处理”处

理后进样分析;将血清中药物的峰面积比值代入标准曲线方程中计算药物的质量浓度,测得量与加入量的比值乘以100%,计算得到方法回收率,其结果均在(100 \pm 15)%范围内,见表2。

表 2 测定方法的回收率 ($n=6$)Table 2 Recovery of the developed UPLC method ($n=6$)

加入量 Nominal concentration ($\mu\text{g/mL}$)	测得量 Detected concentration ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 Recovery (%)	RSD (%)
0.183	0.176 ± 0.011	96.0	6.6
0.914	0.923 ± 0.068	101	7.4
7.315	7.300 ± 0.650	99.8	8.9

3.1.5 稳定性实验

配制高、中、低 3 种浓度 7.315、0.914、0.183 $\mu\text{g/mL}$ 的藁本内酯血清质控样品各 6 份,按如下 3 种方法处理后测定,(1)冻融循环稳定性:反复冻融

3 次后处理并测定;(2)短期稳定性:将处理好的样品于室温下放置 4 h 后测定;(3)长期稳定性:将“2.5 项”下所得残渣置-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻 10 d 后测定。数据均以“ $\bar{X} \pm SD$ ”表示,见表 3。

表 3 样品稳定性的测定 ($n=6$)Table 3 Stability of sample ($n=6$)

质量浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	稳定性 Stability (%)		
	冻融循环 3 次 Freeze-thaw stability	短期稳定性 Short-term stability	长期稳定性 Long-term stability
0.183	0.179 ± 0.013	0.180 ± 0.012	0.177 ± 0.015
0.914	0.905 ± 0.059	0.911 ± 0.0665	0.901 ± 0.0057
7.315	7.295 ± 0.598	7.313 ± 0.512	7.301 ± 0.548

3.2 药动学测定结果

将大鼠灌胃当归石油醚萃取物后血清样品在上述方法下测定,将峰面积比值按标准曲线计算出藁本内酯的血药浓度,数据运用 DAS 3.0 进行处理。

结果表明低剂量组未检测到,而高、中剂量组的藁本内酯在大鼠体内较符合二室模型,各项药动学参数见表 4,所有数据均以“ $\bar{X} \pm SD$ ”表示。藁本内酯在大鼠体内的药-时曲线见图 2。

表 4 大鼠灌胃当归石油醚萃取物后藁本内酯药动学参数

Table 4 Pharmacokinetic parameters of ligustilide in rats after i. g. administration of petroleum ether extract of *A. Sinensis* (Oliv.) Diels

模型参数 Model parameters	$\bar{X} \pm SD$	
	高剂量组 High dose group	中剂量组 Middle dose group
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0.14 ± 0.01	0.35 ± 0.07
$t_{1/2\beta}$ (h)	4.08 ± 0.25	3.06 ± 0.82
$V1/F$ (L/kg)	12.382 ± 3.10	29.54 ± 9.32
$V2/F$ (L/kg)	78.02 ± 22.63	26.43 ± 7.81
$CL1/F$ (L/h/kg)	27.26 ± 3.84	23.26 ± 5.43
$CL2/F$ (L/h/kg)	30.61 ± 9.80	14.23 ± 4.47
$AUC(0-t)$ ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{h}$)	0.95 ± 0.17	0.61 ± 0.12
$AUC(0-\infty)$ ($\mu\text{g/mL} \cdot \text{h}$)	1.12 ± 0.25	0.70 ± 0.18
T_{\max} (h)	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.01
C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	0.38 ± 0.04	0.33 ± 0.02

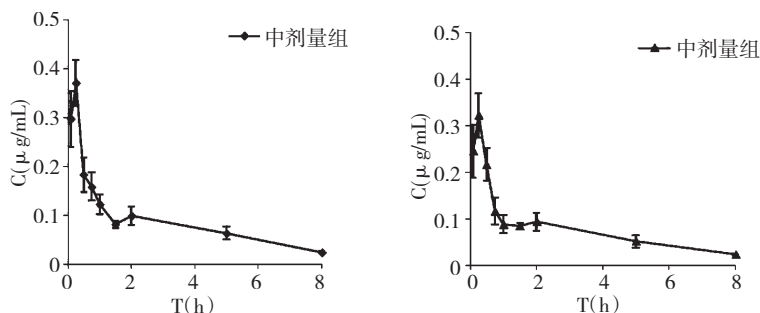


图2 藁本内酯在大鼠体内的药-时曲线

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curve of ligustilide after i. g. administration of petroleum ether extract of *A. Sinensis* (Oliv.) Diels to rats (n = 6)

4 讨论

4.1 萃取剂的考察

分别考察了乙醚、正己烷、乙醚 + 10% HCl、正己烷 + 10% HCl 等 4 种萃取溶剂, 结果发现, 正己烷萃取时的萃取效率最高, 且不会出现乳化现象, 内源性物质对被测物和内标物的干扰小, 操作简单快速、成本低, 且可以保证提取回收率和方法重现性, 所以选择该溶剂为血清样品萃取剂。

4.2 流动相的考察

本研究发现, 藁本内酯在甲醇-水流动相系统中不能与内源性物质很好的分开, 而选择乙腈-水作为流动相时能达到良好的分离效果。除此之外针对峰形稍微拖尾的现象, 本实验分别考察了向水中加入 0.03% 三氟乙酸、0.1% 甲酸, 经比较, 前者效果良好, 故最终确定乙腈-0.03% 三氟乙酸水作为流动相。

4.3 双峰现象的推测

药理学实验结果表明化合物藁本内酯药-时曲线呈双峰现象, 且第一峰高大于第二峰, 出现该现象的原因可能是受肝肠循环或不同肠断吸收差异的影响, 也可能是不规则胃排空导致。

4.4 药动结果的阐明

为了探讨当归石油醚萃取物中藁本内酯的在大鼠体内的药动学特性, 我们选取高、中、低三个剂量进行实验。结果显示, 低剂量组由于藁本内酯的含量过低, 吸收不明显, 受方法的灵敏度限制, 含量已降至定量限下, 无法进行定量。而高、中剂量组藁本内酯分别在 0.20、0.19 h 达峰, $t_{1/2\beta}$ 分别为 4.08、3.06 h 左右, 表明藁本内酯具有吸收快, 消除亦快, 在体内维持有效血药浓度时间较短等特点。高、中剂量组的 AUC 分别为 0.95、0.61 ($\mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{h}$), 此结果与 Chen YY^[7] 的研究结果较为一致。根据表观

分布容积参数 V_1/F 得知, 其数值远大于大鼠体液体积 0.67 L/kg, 因此藁本内酯同样具有分布广的特点。从高、中剂量组大鼠的参数及药-时曲线可以看出, 两者吸收相当, 有可能是因为中剂量时药物吸收已经饱和, 增加剂量并不能使生物利用度相应的增加, 表明当归中该成分为非剂量依赖型, 此项结果与其他文献报道有所差异, Ru Yan^[9] 在研究大鼠腹腔注射川芎药代动力学时发现, 川芎中藁本内酯呈剂量依赖型, 造成如此差异的原因可能是所选给药剂量区间有所差异或是不同药材中其余化学成分的影响导致。

综上, 本实验建立的 UPLC-PDA 法可靠、灵敏, 能够快速、准确的测定藁本内酯在大鼠体内的血药浓度, 所得药动学结果, 可为临床合理用药提供一定基础。

参考文献

- 1 Chan SK, Cheng TY, Lin G. Relaxation effects of ligustilide and senkyunolide A, two main constituents of *Ligusticum chuanxiong*, in rat isolated aorta. *J Ethnopharmacol*, 2007, 111:677-680.
- 2 Kuang X, Yao Y, Du JR, et al. Neuroprotective role of Z-ligustilide against forebrain ischemic injury in ICR mice. *Brain Res*, 2006, 1102:145-153.
- 3 Kuang X, Du JR, Liu YX, et al. Posts ischemic administration of Z-ligustilide ameliorates cognitive dysfunction and brain damage induced by permanent forebrain ischemia in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2008, 88:213-221.
- 4 Guo JM, Shang EX, Duan JA, et al. Determination of ligustilide in the brains of freely moving rats using microdialysis coupled with ultra performance liquid chromatography / mass spectrometry. *Fitoterapia*, 2011, 82:441-445.