川芎嗪、阿魏酸和延胡索乙素在模型与正常大鼠体内药动学比较研究

冯彬彬[1]，张建海[1]，牛小花[1]，尚芳红[2]，徐晓玉[2*]

1. 重庆三峡医药高等专科学校，重庆 404120
2. 西南大学，重庆 400716

摘 要：目的 探讨川芎、延胡索中主要活性成分在模型与正常大鼠体内药动学规律与差异。**方法** SD 大鼠分为对照组和子宫内膜异位症模型组，每组 8 只，各组均按川芎嗪 50 mg/kg、阿魏酸 30 mg/kg、延胡索乙素 20 mg/kg ig 给药，采用高效液相色谱法测定各组大鼠血浆中川芎嗪、阿魏酸和延胡索乙素的质量浓度，DAS2.0 程序计算药动学参数。**结果** 模型组川芎嗪药时曲线下面积（$AUC_{0\sim t}$）、达峰浓度（C_{max}）、达峰时间（t_{max}）、半衰期（$t_{1/2}$）和平均驻留时间（$MRT_{0\sim t}$）与对照组相比差异均不显著（$P>0.05$）；模型组阿魏酸 $AUC_{0\sim t}$、C_{max}、t_{max} 都小于对照组，但差异没有显著性（$P>0.05$），$t_{1/2}$、$MRT_{0\sim t}$ 显著小于对照组（$P<0.05$）；模型组延胡索乙素 $AUC_{0\sim t}$、C_{max}、t_{max}、$MRT_{0\sim t}$ 均显著大于对照组（$P<0.05$）。**结论** 川芎、延胡索主要活性成分在正常大鼠和模型大鼠的体内过程有所不同。阿魏酸在模型大鼠体内消除更快，延胡索乙素在模型大鼠体内吸收浓度更高、消除更慢，川芎嗪在正常及模型大鼠的体内过程无显著性差异。

关键词： 川芎；延胡索；子宫内膜异位症；药动学；川芎嗪；阿魏酸；延胡索乙素

中图分类号： R285.51 **文献标志码：** A **文章编号：** 0253 - 2670(2015)10 - 1493 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.10.016

Comparative study on *in vivo* pharmacokinetics of tetramethylpyrazine, ferulic acid, and tetrahydropalmatine between model and normal rats

FENG Bin-bin[1], ZHANG Jian-hai[1], NIU Xiao-hua[1], SHANG Fang-hong[2], XU Xiao-yu[2]

1. Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China
2. Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: Objective To study the *in vivo* pharmacokinetic law and difference of active compounds from *Chuanxiong Rhizoma* and *Corydalis Rhizoma* between control and model rats. **Methods** Sixteen Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups: control and model rats with endometriosis, eight rats in each group. All the rats were ig administrated of tetramethylpyrazine (50 mg/kg), ferulic acid (30 mg/kg), and tetrahydropalmatine (20 mg/kg). All the concentration of tetramethylpyrazine, ferulic acid, and tetrahydropalmatine in plasma was analyzed by RP-HPLC and the data were treated by DAS 2.0 program. **Results** The main pharmacokinetic parameters of tetramethylpyrazine in the model group, such as $AUC_{0\sim t}$, C_{max}, t_{max}, $t_{1/2}$, and $MRT_{0\sim t}$, were no significant difference compared with the control group ($P > 0.05$), and $AUC_{0\sim t}$, C_{max}, and t_{max} of ferulic acid in model group were less than those in the control group with no significant difference ($P > 0.05$); $t_{1/2}$ and $MRT_{0\sim t}$ of ferulic acid in the model group were obviously less than those in control group ($P<0.05$); $AUC_{0\sim t}$, C_{max}, t_{max}, and $MRT_{0\sim t}$ of tetrahydropalmatine in the model group were bigger than those in the control group with significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** There is difference of pharmacokinetics of the main active compounds from *Chuanxiong Rhizoma* and *Corydalis Rhizoma* between model and control rats. Ferulic acid is removed more quickly in model rats, tetrahydropalmatine is absorbed highly but removed slower, tetramethylpyrazine is no significant difference comparee with the control group.

Key words: *Chuanxiong Rhizoma*; *Corydalis Rhizoma*; endometriosis; pharmacokinetics; tetramethylpyrazine; ferulic acid; tetrahydropalmatine

收稿日期： 2014-10-10

基金项目： 重庆市重大科技攻关项目（CSTC2008AA5004）；重庆市自然科学基金项目（CSTC2012jjA10012）

作者简介： 冯彬彬，女，博士，副教授，主要从事中药药理与新药开发。E-mail: fbb200596@126.com

***通信作者** 徐晓玉，女，教授，博士生导师。E-mail: xxy0618@sina.com

长期以来，中药活性物质体内过程的研究是中药药动学的研究热点[1]。资料显示中药在生物体不同的机能状态下，其药理作用和体内过程可能不同[2]。既往有研究报道中药在证侯动物模型中的药动学特征与正常动物体内有差异[3-4]，研究中药在病理情况下药动学特征与在正常动物体内特征的差异，对临床用药有指导意义。川芎 *Chuanxiong Rhizoma* 和延胡索 *Corydalis Rhizoma* 作为我国传统活血化瘀中药，常配伍使用治疗血瘀证，其中含有多种有效成分如川芎嗪、阿魏酸、延胡索乙素等，目前川芎嗪、阿魏酸和延胡索乙素的药动学研究多是在正常动物体内进行的[5-9]，而病理状态下的药动学特点未见报道。如何系统评价川芎嗪、阿魏酸、延胡索乙素在病理大鼠体内的药动学行为，建立符合中药多组分、多靶点整体药效作用特征的中药药动学研究新思路与新方法是本研究所需要解决的关键科学问题。为此，本实验以活血化瘀中药川芎、延胡索的 3 种主要有效成分为模型药物，以血瘀为主的妇科疾病子宫内膜症（痛经或持续下腹痛、不孕、月经失调[10]）为观察疾病，以子宫内膜异位症大鼠模型为疾病动物模型，进行 3 种有效成分在大鼠子宫内膜异位症模型与正常大鼠体内多组分整合药动学研究。

1 材料

1.1 仪器和药品

高效液相色谱仪（Agilent1200），智能柱温箱，MWD 紫外检测器；H1650-W 台式微量高速离心机（长沙湘仪离心机仪器有限公司）；EL-204 电子天平［梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司］；WH-2 微型涡旋混合仪（上海沪西分析仪器厂）。甲醇为色谱纯（迪马公司）；冰醋酸为分析纯；水为去离子水；川芎嗪（批号 110817-200305）、阿魏酸（批号 110773-200611）、延胡索乙素（批号 110726-200610）对照品均购自中国食品药品检定研究院；香豆素对照品购自 Sigma 公司；川芎嗪、阿魏酸、延胡索乙素原料药（质量分数均在 98%以上）购自南京泽朗有限责任公司。

1.2 动物

SD 大鼠 30 只，雌性，SPF 级，体质量为（240±20）g，由重庆医科大学实验动物中心提供，合格证号 SCXK（渝）2007-0001，动物饲养于 SPF 级实验动物中心，实验环境合格证号 SYXK（渝）2009-0002。

2 方法与结果

2.1 川芎嗪、阿魏酸、延胡索乙素定量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent SB-C_{18} ODS（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为甲醇-0.3%冰醋酸（42∶58）；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 280 nm；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 取川芎嗪对照品 16 mg，精密称定，置 100 mL 量瓶中，加甲醇溶解，并定容至刻度，得储备液为 0.168 8 mg/mL，并将储备液稀释成一系列不同质量浓度的对照品溶液；同样方法配制质量浓度为 0.164 8 mg/mL 阿魏酸储备液，质量浓度为 0.825 0 mg/mL 延胡索乙素储备液，并各自稀释成一系列不同质量浓度的对照品溶液；质量浓度为 0.73 mg/mL 香豆素储备液，再稀释至质量浓度为 7.3 μg/mL 的内标溶液，备用。

2.1.3 标准曲线的制备 精密吸取 8 份大鼠空白血浆各 100 μL，分别精密加入 50 μL 不同质量浓度的川芎嗪、阿魏酸、延胡索乙素对照品溶液和 150 μL 香豆素内标溶液，分别制成含川芎嗪 0.035 1、0.140 6、0.562 5、1.057 0、2.109 0、4.219 0、8.438 0、16.880 0 μg/mL，阿魏酸 0.032 2、0.129 0、0.515 0、1.030 0、2.060 0、4.120 0、8.240 0、16.480 0 μg/mL，延胡索乙素 0.016 1、0.064 6、0.258 3、0.516 5、1.033 0、2.065 0、4.130 0、8.250 0 μg/mL 的系列溶液，涡旋 2 min，10 000 r/min 离心 5 min，上清液过 0.22 μm 微孔滤膜，取 10 μL 进样，分别以川芎嗪、阿魏酸、延胡索乙素各成分和内标的峰面积之比（Y）与川芎嗪、阿魏酸、延胡索乙素各成分质量浓度（X）做回归方程，绘制标准曲线。得到各成分的回归方程分别为川芎嗪：Y＝0.031 8 X＋0.014，r＝0.999 6；阿魏酸：Y＝0.640 5 X－0.068 6，r＝0.999 8；延胡索乙素：Y＝0.149 1 X＋0.018 6，r＝0.999 5。川芎嗪、阿魏酸、延胡索乙素分别在 0.035 1～16.880 0 μg/mL、0.032 2～16.480 0 μg/mL 和 0.016 1～8.250 0 μg/mL 线性关系良好。

2.1.4 专属性考察 分别取空白血浆，空白血浆与川芎嗪、阿魏酸、延胡索乙素对照品混合溶液以及各血浆样品溶液，在上述色谱条件下分别测定，测得的色谱图见图 1。可见，在本色谱条件下，川芎嗪、阿魏酸、延胡索乙素 3 种成分和内标（香豆素）均得到较好分离，无明显干扰峰出现，血浆中杂质不干扰药物浓度的测定。

2.1.5 精密度试验 样品配制同“2.1.3”项，9 份

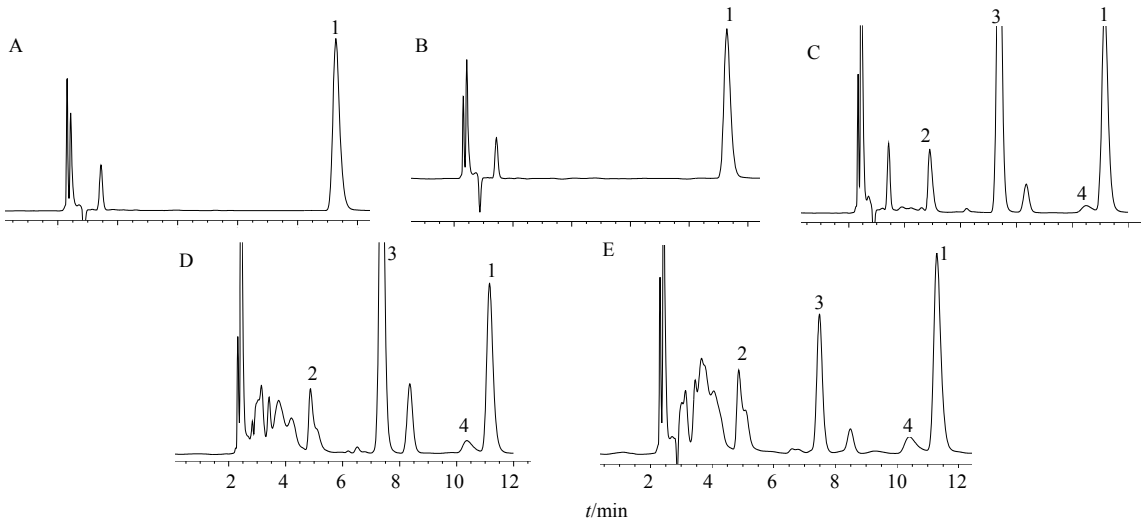

图 1 对照组空白血浆(A)、模型组空白血浆(B)、混合对照品溶液(C)、对照组血浆样品 (D) 和模型组血浆样品 (E) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of blank plasma in control group (A), blank plasma in model group (B), mixed reference solution (C), plasma sample in control group (D), and plasma sample in model group (E)

样品各以 1 d 内测得的各物质质量浓度计算日内精密度，以 1 周内 3 次测定的各物质质量浓度计算日间精密度。结果川芎嗪、阿魏酸、延胡索乙素低、中、高质量浓度的日内精密度 RSD 分别为 5.43%、9.79%、3.43%，13.18%、4.16%、6.74%，2.23%、9.89%、3.72%（n＝5）；日间精密度 RSD 分别为 12.23%、8.71%、3.32%，6.74%、1.77%、3.40%，12.18%、7.79%、4.80%（n＝5）。可以看出川芎嗪、阿魏酸、延胡索乙素低、中、高质量浓度精密度 RSD 均小于 15%，表明精密度良好，符合生物样品精密度要求。

2.1.6 回收率试验 精密吸取大鼠空白血浆 100 μL，分别加入低、中、高不同质量浓度的川芎嗪、阿魏酸、延胡索乙素各成分对照品溶液各 50 μL，再加入 150 μL 香豆素内标溶液，每个质量浓度平行 3 份，配制成川芎嗪、阿魏酸、延胡索乙素各成分质量浓度分别为 0.562 5、4.219 0、8.475 0 μg/mL，0.515 0、4.120 0、8.480 0 μg/mL 和 0.258 3、3.854 0、6.780 0 μg/mL 的 3 种溶液，按“2.1.2”项下方法测定，代入各自标准曲线分别计算川芎嗪、阿魏酸、延胡索乙素各成分在血浆中的质量浓度，并计算回收率。结果川芎嗪、阿魏酸、延胡索乙素低、中、高质量浓度的平均回收率（RSD）分别为 98.80%（3.17%）、104.22%（5.12%）、96.66%（1.91%），97.88%（6.98%）、110.43%（1.96%）、98.77%（1.30%），102.38%（5.44%）、97.34%（3.36%）、99.88%（1.39%），回收率均在 80%～120%，RSD 均小于 10%，表明该方法回收率符合要求。

2.2 子宫内膜异位症模型的制备

2.2.1 动情期大鼠的选择 实验前 SD 大鼠正常饲养 2 周适应新环境，自由饮食饮水。选择大鼠的动情期：每天定时进行阴道涂片检查，选择动情周期为 4～5 d，并连续有 2 个正常动情周期的大鼠，在动情期对大鼠行造模手术。具体操作步骤：固定大鼠，暴露下腹部，将消毒棉签用生理盐水湿润后插入动物阴道内，并在阴道内轻轻转动一周后取出，将带有阴道内含物的棉签在载玻片上均匀涂片，空气中自然挥干。将涂片放入 95%乙醇中固定 30 min，苏木素染色 2 min，自来水冲洗干净，干燥。载玻片放在双目显微镜下观察阴道涂片的细胞学变化。根据大鼠阴道细胞脱落情况确定大鼠动情期。动情间期：有大量的白细胞和少量有核上皮细胞；动情前期：有大量有核上皮细胞，偶有少量角化上皮细胞，无白细胞；动情期：基本全部是大量形态不规则的无核角化上皮细胞，间有少量上皮细胞；动情后期：大量白细胞，也有少量融合的角化上皮细胞[11]。

2.2.2 SD大鼠自体子宫内膜异位症模型复制 将动情期大鼠用 3.5%水合氯醛 ip 麻醉后，固定其四肢及

头部于消毒后的手术台板上，下腹部剪毛，进行常规消毒。在尿道口上约 1 cm 处纵切约 1.5 cm 切口，剪开皮肤及肌肉，游离右侧子宫，两端结扎，并结扎两端间的子宫系膜血管，切除远端约 1.5 cm 长的子宫段，放入盛有生理盐水的培养皿中，去除多余的脂肪组织，用眼科剪将子宫组织剪成约 5 mm×5 mm 的 3 块，一块送病理检验证实是子宫组织，另 2 块以其内膜对着腹壁，浆膜朝向腹腔缝于血管丰富的腹壁，用 3-0 的线固定四角于腹壁内侧；关腹前用生理盐水冲洗腹腔，并用庆大霉素进行消毒，腹腔用 3-0 线连续缝合，用注射庆大霉素消毒[12]。术后正常清洁饲养，用庆大霉素注射液消毒 3 d。造模 28 d 后，再次开腹观察异位子宫内膜的生长情况。用游标卡尺测量异位灶大小，符合以下条件者为模型成功[13]：移植物体积增大，呈隆起透亮的小囊状，内有液体积聚，外被结缔组织或大网膜覆盖并有血管生成；用游标卡尺测量移植物大小，移植物体积≥ 8 mm^3；切取移植物送病检，证实移植物存活并有子宫内膜上皮、间质细胞及腺体生长。

2.3　分组及血浆样品制备

取 8 只符合模型成功标准的大鼠作为子宫内膜异位症模型组，另取 8 只正常大鼠为对照组，受试大鼠禁食不禁水 12 h 后，根据前期工作及相关预试验较为理想的结果[5-7]，分别按川芎嗪 50 mg/kg、阿魏酸 30 mg/kg、延胡索乙素 20 mg/kg ig 给药，并于给药前与给药后 5、10、20、30、45、60、90、120、180、300、480、720、1 440 min 眼眶取静脉血 0.5 mL，所采血液均放入装有肝素钠的 EP 管中，10 000 r/min 离心 5 min；取血浆放−20℃冰箱保存，待测。

2.4　血样处理

精密吸取大鼠血浆样品 100 μL，加 150 μL 内标溶液和 150 μL 甲醇，按“2.1.3”项下的处理方法处理检测。

2.5　药动学结果

所得数据采用 DAS 2.0 药动学程序进行处理，川芎嗪、阿魏酸、延胡索乙素在正常大鼠及子宫内膜异位症模型大鼠体内药时曲线见图 2，各成分非房室模型药动学参数见表 1。结果显示，3 种活性成分主要药动学参数存在不同程度的差异。模型组川芎嗪药时曲线下面积（$AUC_{0\sim t}$）、达峰浓度（C_{max}）、达峰时间（t_{max}）、半衰期（$t_{1/2}$）和平均驻留时间（$MRT_{0\sim t}$）与对照组相比差异均没有显著性（$P>0.05$）；模型组阿魏酸 $AUC_{0\sim t}$、C_{max}、t_{max} 均小于对照组，但差异没有显著性（$P>0.05$），$t_{1/2}$、$MRT_{0\sim t}$ 显著小于对照组（$P<0.05$）；模型组延胡索乙素 $AUC_{0\sim t}$、C_{max}、t_{max}、$t_{1/2}$、$MRT_{0\sim t}$ 均大于对照组，其中 $AUC_{0\sim t}$、C_{max}、t_{max}、$MRT_{0\sim t}$ 均有显著性（$P<0.05$），二者 $t_{1/2}$ 没有差异（$P>0.05$）。

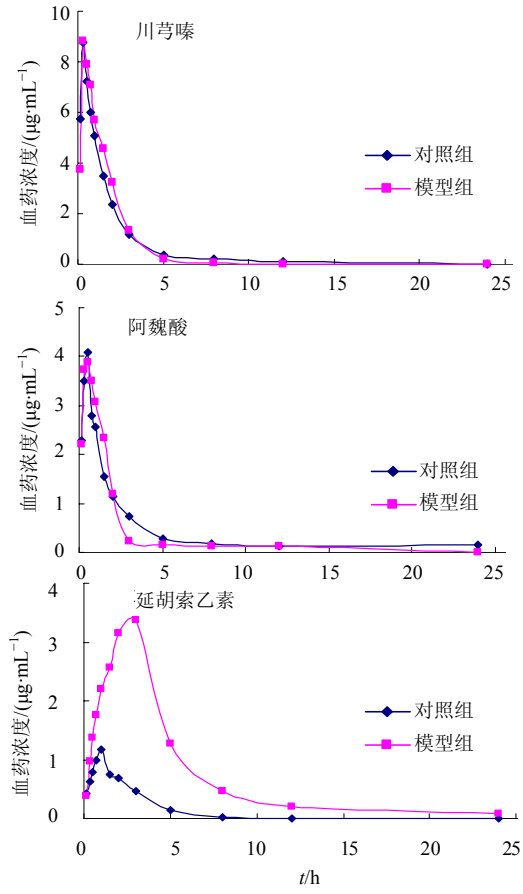

图 2　对照组和模型组大鼠 3 种成分药-时曲线

Fig. 2　Mean plasma concentration-time curves of tetramethylpyrazine, ferulic acid, and tetrahydropalmatine of rats in control and model groups

3　讨论

3.1　测定方法的选择

本实验采用本课题组建立的稳定方法[5-7]确定色谱条件为甲醇-0.3%冰醋酸（42∶58），体积流量 1.0 mL/min，柱温 30 ℃。该测定方法精密度高，回收率好，3 种活性成分和内标峰型良好，无杂质干扰，基线稳定，适用于生物样本的测定。经方法学确证，复方在色谱条件下，分离效果好，空白血浆对川芎嗪、阿魏酸、延胡索乙素没有干扰。各方法回收率在 80%～120%，日内、日间精密度均小于 15%，方法专属性强，灵敏度高，符合生物制品 HPLC 检测要求。

表 1 川芎嗪、阿魏酸和延胡索乙素在对照组和模型组大鼠中药动学参数（$\bar{x} \pm s$, $n = 8$）

Table 1 Pharmacokinetic parameters of tetramethylpyrazine, ferulic acid, and tetrahydropalmatine of rats in control and model groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

参数	单位	川芎嗪		阿魏酸		延胡索乙素	
		对照组	模型组	对照组	模型组	对照组	模型组
$AUC_{0\sim t}$	mg·h·L^{-1}	13.375±7.135	14.550±2.896	8.586± 4.781	6.816±0.980	2.895±1.606	16.079±5.877*
$MRT_{0\sim t}$	h	1.412±0.417	1.398±0.124	6.158± 3.038	1.646±0.281*	1.985±0.346	3.717±1.778*
$t_{1/2}$	h	1.102±0.433	0.880±0.313	14.746± 1.485	4.801±2.263*	1.179±0.391	2.081±1.987
t_{max}	h	0.375±0.077	0.361±0.068	0.510± 0.246	0.417±0.091	0.844±0.129	2.500±0.548*
C_{max}	mg·L^{-1}	8.796±3.276	8.828±1.520	4.087± 2.245	3.895±0.455	1.165±0.644	3.370±0.617*

与对照组比较：*P<0.05

*P < 0.05 *vs* control group

3.2 造模方法的确定

子宫内膜异位症是妇科领域重要研究课题之一。本实验采用的动物模型的制作主要基于子宫内膜种植学说，通过手术将子宫内膜组织自体移植于腹腔各处（人体异位内膜的常见部位），手术移植法诱发大鼠模型，成功率较高，是目前国内外建立该模型的主要方法。造模过程中首先要掌握好大鼠的动情期，其次要注意内膜对着腹壁，浆膜朝向腹腔缝于血管丰富的腹壁固定。

3.3 药动学特征

本实验结果表明川芎嗪的 $AUC_{0\sim t}$、$MRT_{0\sim t}$、t_{max}、C_{max} 在正常和病理状态下没有差异，但是病理状态下的 $AUC_{0\sim t}$ 和 C_{max} 大于对照组，$MRT_{0\sim t}$ 和 $t_{1/2}$ 较正常状态下短，表明川芎嗪成分在病理条件下有吸收增加趋势，消除有加快趋势；模型组阿魏酸 $AUC_{0\sim t}$、C_{max}、t_{max} 都小于对照组，但差异没有显著性（P>0.05），$t_{1/2}$、$MRT_{0\sim t}$ 显著小于对照组（P<0.05），提示阿魏酸在大鼠病理状态下吸收快，消除也快，不宜在体内蓄积；模型组延胡索乙素 $AUC_{0\sim t}$、C_{max}、t_{max}、$t_{1/2}$、$MRT_{0\sim t}$ 均大于对照组，其中 $AUC_{0\sim t}$、C_{max}、t_{max}、$MRT_{0\sim t}$ 均有显著性（P<0.05），提示延胡索乙素成分在大鼠病理状态下吸收显著增加，作用时间明显延长。本实验结果说明病理条件均不同程度影响 3 种活性成分的吸收和消除。另外，本实验通过病理状态下给药从药动学角度证明了药物在不同环境下体内动力学特征存在差异，实验结果也为临床试验提供了依据。

参考文献

[1] 刘昌孝. 中药药代动力学研究的难点与热点 [J]. 药学学报, 2005, 40(5): 395-401.

[2] 徐晓玉. 中药药理学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2010.

[3] 黄 熙, 任 平, 文爱东, 等. 脾虚大鼠的川弯嗪药物动力学特征与血液流变学 [J]. 第四军医大学学报, 1994, 15(1): 71-72.

[4] 田中茂. 血中浓度测定法对汉方方剂的“证”与疗效决定法的开发 [J]. 国外医学: 中医中药分册, 1998, 10(3): 58-59.

[5] 冯彬彬, 张建海, 张继芬, 等. 川芎嗪、阿魏酸及其配伍药代动力学比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(7): 900-903.

[6] 冯彬彬, 张建海, 张继芬, 等. 不同配伍对川芎嗪体内药代动力学影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 39(9): 1311-1313.

[7] 冯彬彬, 张建海, 徐晓玉. 川芎嗪、阿魏酸对延胡索乙素大鼠体内药动学的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2664-2668.

[8] XiaoY Y, Ping Q N, Chen Z P. The enhancing effect of synthetical borneol on the absorption of tetramethylpyrazine-phosphate in mouse [J]. *Int J Pharm*, 2007, 337(12): 74-79.

[9] 邹全飞, 马 坤, 陆 榕. 阿魏酸药动学研究进展 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(4): 297-301.

[10] 谭先杰, 郎景和. 子宫内膜异位症的基础研究进展 [J]. 中华妇产科杂志, 1998, 33(6): 378-380.

[11] Sharpe K L, Bertero M C, Lyon B P, *et al*. Follicular atresia and infertility in rats treated with a gonadotropin-releasing hormone antagonist [J]. *Eneocrinology*, 1990, 127(1): 25-31.

[12] Vernon M W, Wilson E A. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat [J]. *Fertil Steril*, 1985, 44(5): 684-694.

[13] 常 暖, 寒 冰, 李同玺. 大鼠子宫内膜异位症模型的建立及其病理学观察 [J]. 临床与实验病理学杂志, 1998, 14(1): 67-69.