

- 628-630.
- [4] 杨南林,程翼宇,吴永江. 中药材三七中皂苷类成分的近红外光谱快速无损分析新方法[J]. 化学学报, 20003, 61(3): 393-398.
- [5] 虞科,胡楚楚,程翼宇. 近红外光谱法测定复方丹参滴丸中的3种有效成分[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(3): 226-229.
- [6] 宋丽丽,徐晓杰,范丙义,等. 近红外光谱法测定六味地黄丸中丹皮酚[J]. 中草药, 2005, 36(8): 1174-1177.
- [7] 王钢力,石岩,魏玉海,等. 近红外光谱鉴别冬虫夏草道地药材[J]. 中草药, 2006, 10(37): 1569-1571.

川芎挥发油中藁本内酯在大鼠体内的药动学研究

刘洋¹, 胡连栋², 唐星^{3*}

(1. 郑州大学药学院, 河南 郑州 450000; 2. 河北大学药学院, 河北 保定 071002;
3. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 测定川芎挥发油中藁本内酯在大鼠体内的药动学。方法 采用 RP-HPLC 法, 以蛇床子素为内标物测定大鼠口服川芎挥发油的 β -环糊精包合物后藁本内酯的血药浓度, 使用 3P97 药动学软件计算其药动学参数。结果 藁本内酯在大鼠体内符合二室模型, 主要的药动学参数: $t_{1/2}(\alpha)$ 为 $(1.429 \pm 1.161) \text{ h}$, $t_{1/2}(\beta)$ 为 $(6.877 \pm 2.275) \text{ h}$, $t(\text{peak})$ 为 $(3.401 \pm 1.951) \text{ h}$, AUC 为 $(70.87 \pm 25.92) \mu\text{g/mL} \cdot \text{h}$ 。结论 以蛇床子素为内标, RP-HPLC 法能够准确、灵敏地测定藁本内酯在大鼠体内的药动学。

关键词: 川芎; 藁本内酯; 蛇床子素; 药动学; 反相高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)02-0228-03

Pharmacokinetics of ligustilide in *Ligusticum chuanxiong* essential oil in rats in vivo

LIU Yang¹, HU Lian-dong², TANG Xing³

(1. College of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China; 2. College of Pharmacy, Hebei University, Baoding 071002, China; 3. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: **Objective** To investigate the *in vivo* pharmacokinetics of ligustilide in *Ligusticum chuanxiong* essential oil after ig administration in rats. **Methods** The concentration of ligustilide in plasma of rats after ig administration of β -cyclodextrin compound in *L. chuanxiong* essential oil was determined by RP-HPLC method with the osthole as the internal standard. The plasma concentration-time curve was plotted. The main pharmacokinetic parameters of ligustilide were obtained by 3P97 software. **Results** Ligustilide in rats fits the two compartments model and the main pharmacokinetic parameters were as follows: $t_{1/2}(\alpha)$, $(1.429 \pm 1.161) \text{ h}$; $t_{1/2}(\beta)$, $(6.877 \pm 2.275) \text{ h}$; $t(\text{peak})$, $(3.401 \pm 1.951) \text{ h}$; and AUC were $(70.87 \pm 25.92) \mu\text{g/mL} \cdot \text{h}$, respectively. **Conclusion** RP-HPLC Method with osthole as the internal standard is accurate, sensitive, and rapid for the study on pharmacokinetics of ligustiliden in rats *in vivo*.

Key words: *Ligusticum chuanxiong* Hort.; ligustilide; osthole; pharmacokinetics; RP-HPLC

藁本内酯为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 挥发油的主要活性成分, 具有较强的抗胆碱作用, 是评价川芎药材及其制剂的重要依据之一^[1~4]。近年来随着研究的深入, 发现藁本内酯是一个很有发展前途的化合物, 相比于川芎中的川芎嗪、阿魏酸等成分而言, 藁本内酯的研究更有必要深入化^[5]。由于藁本内酯稳定性问题十分突出, 因此其药动学的研究报道鲜见。本研究采用 CO₂ 超临界萃取技术提取川芎中的挥发油成分, 测

定其中藁本内酯, 并采用 β -环糊精包合技术将挥发油固化和稳定化后给大鼠灌胃, 选择合适的内标物测定了藁本内酯大鼠口服后的体内药动学^[6]。

1 仪器与试剂

CLC-6A 型日本岛津高效液相色谱仪, SPD-6AV 型检测器, Anasta 色谱工作站, TGL-16B 型超速离心机(上海安亭科学仪器厂), YKH-快速混合器(江西医疗器械厂)。

藁本内酯对照品(自行提纯, 经 GC-MS 分析质

* 收稿日期: 2008-05-16

作者简介: 刘洋(1980—), 女, 河南省新乡市人, 讲师, 从事基因药物给药系统研究工作。

Tel: 13673638040 E-mail: liuyang8016@126.com

量分数为 98 %) ,肝素钠注射液(天津市生物化学制药厂) ,氯仿、甲醇为色谱纯;β-环糊精(批号 20040213,浙江诚意药业有限公司)。

Wistar 种大鼠,雌雄兼用,体质量 230 ~ 250 g,沈阳药科大学实验动物中心提供,合格号:SYXK(辽)2004-006。

2 方法与结果

2.1 检测波长的选择:将藁本内酯对照品溶解于甲醇,配制成 940 μg/mL 溶液,在紫外 200 ~ 400 nm 波长进行扫描。结果在 280、320 nm 处有最大吸收。经高效液相色谱法测定,320 nm 处灵敏度更高,故选用 320 nm 为检测波长。

2.2 色谱条件:色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm);预柱:YWG C₁₈ (10 mm × 4 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水-冰醋酸(78:22:0.3);体积流量:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长:320 nm。

2.3 血浆样品的采集与处理:10 只大鼠禁食 12 h,自由饮水,口服川芎超临界 CO₂ 萃取物的 β-环糊精包合物 40 mg/100 g,于给药后 0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、12、15、24 h 眼眶静脉取血 0.5 mL,经肝素抗凝后 4 000 r/min 离心 10 min。吸取 0.2 mL 血浆,加入 52.5 μg/mL 内标物蛇床子素溶液 10 μL,涡旋混合 2 min,加入甲醇 800 μL,涡旋混合 5 min,4 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液。用相同量的甲醇二次提取,合并两次所得的上清液,于 40℃ 水浴, N₂ 吹干,加入 100 μL 甲醇-氯仿(1:1)溶解残渣,进样 20 μL,内标法定量。

2.4 标准曲线与检测限:取空白血浆 200 μL,加入 1.210、2.415、6.040、12.08、24.15、60.39、150.96 μg/mL 藁本内酯对照品溶液 20 μL,52.50 μg/mL 内标物蛇床子素 10 μL,混匀,配制成相当于血浆药物质量浓度为 0.210、0.525、1.05、2.10、5.25、13.1、52.5 μg/mL 的血浆样品,进样分析,记录色谱图。以藁本内酯峰面积与内标物峰面积之比对质量浓度进行线性回归,得标准曲线方程 $Y = 46.38 X + 13.19$, $r = 0.9996$ 。结果表明血浆中藁本内酯在 0.210 ~ 52.5 μg/mL 线性关系良好。血浆中药物的检测限为 0.105 μg/mL。

2.5 方法的专属性:取空白血浆、含藁本内酯和蛇床子素的空白血浆、受试大鼠口服包合物后采集的血浆,按血浆样品的采集与处理项下处理,进样,得色谱图,见图 1。结果表明,血浆样品中藁本内酯与内标蛇床子素的保留时间分别为 6.5、8.0 min,血

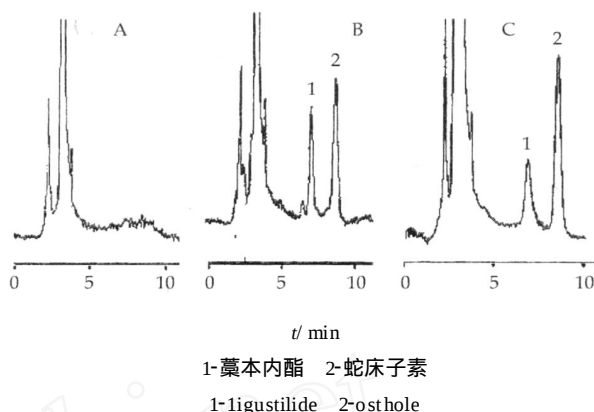


图 1 空白血浆(A)、含藁本内酯和蛇床子素的空白血浆(B)、口服藁本内酯后的血浆样品(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of blank plasma (A), blank plasma with ligustilide and osthole (B), and plasma sample after ig administration of L. chuanxiong essential oil

浆中的内源性物质不干扰测定。

2.6 精密度试验:将 3 个质量浓度的藁本内酯血浆样品一式 5 份,1 d 内经提取后进样分析,计算 3 种质量浓度的日内 RSD。同时配制 5 份含藁本内酯的血浆样品于 -20℃ 冰箱冷冻保存,分别于 5 d 提取,进行测定,计算日间 RSD,结果见表 1。

表 1 测定方法的精密度(n=5)

质量浓度/(μg · mL ⁻¹)	日内 RSD/ %	日间 RSD/ %
0.525	7.91	12.33
1.05	6.54	10.25
5.25	3.36	8.23

2.7 回收率试验:取空白血浆 200 μL 15 份,加入 6.04、12.08、60.39 μg/mL 藁本内酯对照品溶液适量,各 5 份,配制 0.525、1.05、5.25 μg/mL 3 个质量浓度,处理,进样分析。以样品的峰面积与相同质量浓度的对照品峰面积之比计算提取回收率。并将血浆中药物的峰面积代入标准曲线方程中计算药物的质量浓度,与理论值相比计算方法准确度,结果见表 2。

表 2 方法的回收率与准确度(n=5)

质量浓度/(μg · mL ⁻¹)	提取回收率/ %		准确度/ %	
	数值	RSD	数值	RSD
0.525	90.7	3.0	102.2	1.04
1.05	77.2	2.5	96.9	0.86
5.25	83.6	15.8	98.5	0.78

2.8 药动学参数与隔室模型的建立:大鼠口服藁本

内酯后的血药浓度数据用中国数学药理学会编制的药动学软件 3P97 进行处理,结果藁本内酯在大鼠体内较符合二室模型^[7],各项药动学参数见表 3。藁本内酯在大鼠体内的药时曲线见图 2。

表 3 大鼠口服川芎挥发油后藁本内酯药动学参数

Table 3 Pharmacokinetic parameters of ligustilide in rats after ig administration of L. chuanxiong essential oil

参数	单位	$\bar{x} \pm s (n=7)$
A	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	16.18 ± 18.37
Ke	h^{-1}	0.11 ± 0.0373
Ka	h^{-1}	1.851 ± 2.880
lag time	h	0.24 ± 0.1346
$t_{1/2}(\alpha)$	h	1.429 ± 1.161
$t_{1/2}(\beta)$	h	6.877 ± 2.275
t (peak)	h	3.401 ± 1.951
Cmax	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	4.999 ± 1.769
AUC	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$	70.87 ± 25.92
CL/F (s)	$(\text{mg}/100\text{ g}) \cdot \text{h}^{-1}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	0.68 ± 0.1795
V/F (c)	$(\text{mg}/100\text{ g})/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	7.072 ± 3.322

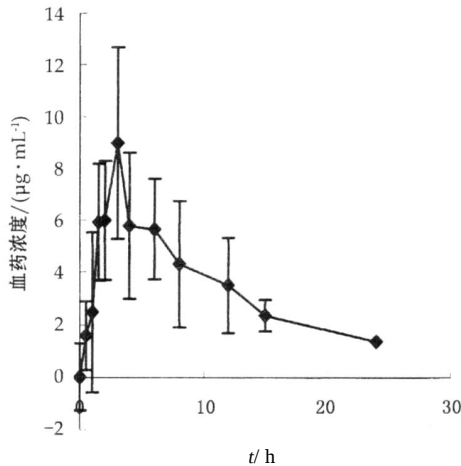


图 2 藁本内酯在大鼠体内的药时曲线

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves of ligustilide in rats after ig administration of L. chuanxiong essential oil

3 讨论

随着藁本内酯在提取物中量的不断提高,其异构化速率加快,室温条件下放置 2~4 d 可下降 50% 以上,长时间放置还可氧化成多种复杂产物乃至最后消失^[8]。本研究针对藁本内酯的不稳定性,采用 β -环糊精进行包合,提高挥发油中藁本内酯的稳定性并且将挥发油固化,避免有效成分损失,用于口服^[6]。本实验经 GC-MS 法测定超临界 CO_2 萃取得川芎挥发油中主要成分为藁本内酯,归一化测定其

质量分数为 64.24%,且其在挥发油中可长期稳定存在^[9]。

检测波长选择时,将川芎挥发油经提纯分离得到的藁本内酯纯品经紫外扫描,得到的吸收光谱图在 280、320 nm 处均有吸收峰,但经高效液相色谱分析可知,320 nm 的吸收更灵敏且杂质对其干扰更小,故选择该波长为检测波长。

流动相的选择时,考虑到藁本内酯的极性与血浆样品的分析情况,选择甲醇-水(78:22),经高效液相测定不同 pH 值流动相时,发现 pH 4.0 时,藁本内酯出峰较快且峰形尖锐,与内标物分离效果较好。使用冰醋酸调节 pH 值,确定流动相的组成为甲醇-水-冰醋酸(78:22:0.3),结果表明,藁本内酯与内标物蛇床子素完全分离,出峰时间分别为 6.5、8.0 min,血浆中的内源性杂质不干扰测定。

藁本内酯极性较强,通常应选用低极性的有机溶剂提取浓缩法,但实验中发现,采用醋酸乙酯、乙醚等有机溶剂提取浓缩后,提取回收率不超过 50%,可能是由于药物的血浆蛋白结合率高且较牢固,蛋白不经变性药物无法游离出来,考虑到内标物蛇床子素在甲醇中溶解度较好,藁本内酯在氯仿中溶解度较好,在甲醇中亦有一定的溶解度,故采用甲醇沉淀蛋白与二次提取相结合,合并上清液吹干浓缩,氯仿-甲醇(1:1)溶解残渣结果表明:提取回收率可达到 80% 以上。

参考文献:

- [1] 蔡永敏. 最新中药药理与临床应用[M]. 北京: 华夏出版社, 1999.
- [2] 李桂生, 李八方. GC 法测定当归油中 Z-藁本内酯[J]. 中草药, 2005, 12(36): 1816-1818.
- [3] Lu, G H, Chan K, Chan C L, et al. Quantification of ligustilides in the roots of *Angelica sinensis* and related umbelliferous medicinal plants by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1046: 101-107.
- [4] Liang M J, He L C, Yang G D. Screening analysis and in vitro vasodilatation of effective components from *Ligusticum Chuanxiong* [J]. *Life Sci*, 2005, 78: 128-133.
- [5] 汪程远, 杜俊蓉, 钱忠明. 藁本内酯的研究进展[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(12): 889-891.
- [6] 李 慧, 边宝林, 孟繁蕴. 藁本内酯的稳定性及 β -环糊精包合工艺的考察[J]. 中草药, 2005, 36(10): 1483-1486.
- [7] 梁文权. 生物药剂学与药物动力学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
- [8] 李桂生, 马成俊, 李香玉. 藁本内酯的稳定性研究及异构化产物的 GC-MS 分析[J]. 中草药, 2000, 31(6): 405-407.
- [9] 周长新, 邹建凯, 陈耀祖. 气相色谱-质谱法测定当归挥发油中藁本内酯的含量[J]. 药物分析杂志, 2002, 22(4): 290-292.