

· 药物代谢 ·

## 芎藭汤超临界提取物中藁本内酯、正丁基苯酞和洋川芎内酯 A 在大鼠体内排泄动力学

赵睁睁<sup>1,2</sup>, 周严严<sup>1,3</sup>, 容蓉<sup>1\*</sup>, 巩丽丽<sup>1</sup>, 郭小藤<sup>1</sup>, 蒋海强<sup>1</sup>, 杨勇<sup>1\*</sup>

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2 寿光市中医医院, 山东潍坊 262700;  
3. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 考察大鼠灌服芎藭汤超临界提取物后, 其有效成分藁本内酯、正丁基苯酞和洋川芎内酯 A 在体内的排泄动力学规律。方法: 将超临界部位对 SD 大鼠灌胃给药后, 按不同时间段收集大鼠的尿液和粪样, 对以上 3 种成分进行 HPLC 测定, 绘制其尿和粪样排泄规律曲线, 考察排泄特征。结果: 藁本内酯 0~24 h 尿排泄率逐渐增高, 24 h 后逐渐降低, 在粪样中 36~48 h 排泄率最高, 此后逐渐降低; 正丁基苯酞在尿液中 12~48 h 排泄率较高; 洋川芎内酯 A 在粪样中 12~48 h 排泄率较高。结论: 尿液中藁本内酯和正丁基苯酞, 粪样中藁本内酯和洋川芎内酯 A 累积排泄量-时间曲线、平均排泄率-时间曲线比较一致, 反映出共性的排泄特征, 可为芎藭汤超临界提取物的整体排泄特征提供参考。

**[关键词]** 芎藭汤; 超临界提取物; 藁本内酯; 正丁基苯酞; 洋川芎内酯 A; 排泄动力学

**[中图分类号]** R284.1; R969.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0080-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030080

**Excretion Kinetics of Ligustilide, Butylphthalide and Senkyunolide A in Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction Part from Xiongqiong Tang in Rats** ZHAO Zheng-zheng<sup>1,2</sup>, ZHOU Yan-yan<sup>1,3</sup>, RONG Rong<sup>1\*</sup>, GONG Li-li<sup>1</sup>, GUO Xiao-teng<sup>1</sup>, JIANG Hai-qiang<sup>1</sup>, YANG Yong<sup>1\*</sup> (1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China; 2. Chinese Medicine Hospital of Shouguang, Weifang 262700, China; 3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the excretion kinetics of the effective components of ligustilide, butylphthalide and senkyunolide A in supercritical CO<sub>2</sub> extraction part after oral administration of Xiongqiong Tang in rats. **Method:** The urine and feces samples of rats were collected according to different time periods after oral administration, the concentration of the above three compounds were determined by HPLC, the excretion curves were established and the excretion characteristics were studied using 3P 97 pharmacokinetic software. **Result:** The excretion curves showed that the urinary excretion rate of ligustilide increased gradually from 0 to 24 h, and then decreased after that, while in the feces the excretion rate of ligustilide approached the maximum from 36 h to 48 h and decreased whereafter; the urinary excretion rate of butylphthalide approached to the maximum gradually from 12 h to 48 h; the excretion rate of senkyunolide A in feces approached the maximum from 12 h to 48 h. **Conclusion:** The cumulative excretion-time curves and the average excretion rate-time curves of ligustilide are in accordance with butylphthalide in urine, so are the ligustilide and senkyunolide A in feces, which reflects a kind of common excretion characteristics. These findings provide reference for investigating the integral excretion pattern of Xiongqiong Tang.

**[Key words]** Xiongqiong Tang; supercritical extract; ligustilide; butylphthalide; senkyunolide A; excretion kinetics

**[收稿日期]** 20140912(003)

**[基金项目]** 山东省自然科学基金项目(ZR2009CM055)

**[第一作者]** 赵睁睁, 硕士, 从事中药复方活性成分与质量控制研究, Tel: 18366371919, E-mail: zhaozhen.g2009@163.com

**[通讯作者]** \* 容蓉, 博士, 教授, 从事中药复方活性成分与质量控制研究, Tel: 0531-89628192, E-mail: rosierong@163.com;

\* 杨勇, 博士, 副教授, 从事中药药理与毒理及经方现代研究, Tel: 0531-89628505, E-mail: yy7204@163.com

芎藭汤出自《千金方》，由当归、川芎等成分组成，具有养荣活血的功效<sup>[1]</sup>。临床上可用于治疗动脉硬化和高血压等。其中藁本内酯(ligustilide, LT)，洋川芎内酯A(senkyunolide A, SA)，正丁基苯酞(*n*-butylphthalide, NBP)为其有效成分。LT具有镇痛抗炎、平喘及较显著的抗子宫平滑肌痉挛作用即治疗痛经的作用<sup>[2]</sup>。SA对大鼠脑缺血具有显著的保护作用<sup>[3]</sup>。NBP具有抗血栓作用<sup>[4]</sup>。超临界提取(supercritical CO<sub>2</sub> extraction, SFE)在中草药挥发油领域具有较大的潜力，具有萃取速度快，可缩短生产周期，提高收率等优点。课题组前期研究工作发现，芎藭汤SFE部位具有一定的抗心肌缺血的作用<sup>[5]</sup>，但其有效成分在体内的排泄动力学规律未见报道，本文主要采用HPLC法研究芎藭汤SFE部位有效成分LT, NBP和SA在大鼠体内排泄动力学的变化，为临床制定更为合理的用药方案提供依据。

## 1 材料

当归、川芎(购自济南建联药店，经山东中医药大学周凤琴教授鉴定当归为伞形科植物当归*Angelica sinensis*的干燥根茎，批号20100821；川芎为伞形科藁本属植物川芎*Ligusticum chuanxiong*的干燥根茎，批号20100911)；LT, SA, NBP对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司，批号分别为110773-200912, 110773-201002, 110773-201010)；甲醇、乙腈(色谱纯，天津市科密欧化学试剂有限公司)；水(娃哈哈纯净水)；其他试剂均为分析纯；SD大鼠，雌雄兼用，体重280~300 g，山东中医药大学实验动物中心提供，许可证号SYXK(鲁)2011-0002。

Agilent 1200高效液相色谱仪(DAD检测器，四元低压梯度泵，柱温箱(美国安捷伦公司)，KQ-5200DB型数控超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司)，Spe-ed SFE CO<sub>2</sub>超临界萃取仪(美国ASI公司)，AF240电子分析天平(瑞士梅特勒公司)，RE-52C旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)，DWF-100电动植物粉碎机(河北省黄骅市科研机械厂)，匀浆器、SZ-1型快速混匀器(江苏金坛市国胜仪器厂)。

## 2 方法

**2.1 色谱条件** ZORBAX SB-C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)，流动相 乙腈(A)-0.085%磷酸水溶液(B)，梯度洗脱(0~10 min, 50% A; 10~20 min, 50% → 60% A)，检测波长 NBP 218 nm, LT 328 nm, SA 280 nm, 参比波长为360 nm，

流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>，柱温 35 °C，进样量 20 μL。

## 2.2 溶液的制备

**2.2.1 系列对照品溶液的配制** 分别精密称取LT, SA, NBP对照品适量，加70%甲醇溶解，制得质量浓度分别为104, 418, 84 mg·L<sup>-1</sup>对照品储备液。分别精密量取上述储备液适量，用70%甲醇逐级稀释成系列浓度对照品溶液，置冰箱保存。

**2.2.2 SFE部位灌胃溶液** 当归、川芎药材粉碎，过40目筛，分别取250 g，混合，投入萃取釜中，在萃取压力20 MPa，提取温度45 °C，CO<sub>2</sub>流量20 kg·h<sup>-1</sup>的条件下提取24 h。萃取物从分离釜下方收集，称重(30.35 g)，4 °C低温保存，备用。精密称取芎藭汤复方SFE提取物6.68 g，加少许聚山梨酸酯，用水溶解，超声使分散均匀定容至25 mL，得SFE部位灌胃溶液(相当于原药材4.40 g·mL<sup>-1</sup>)。

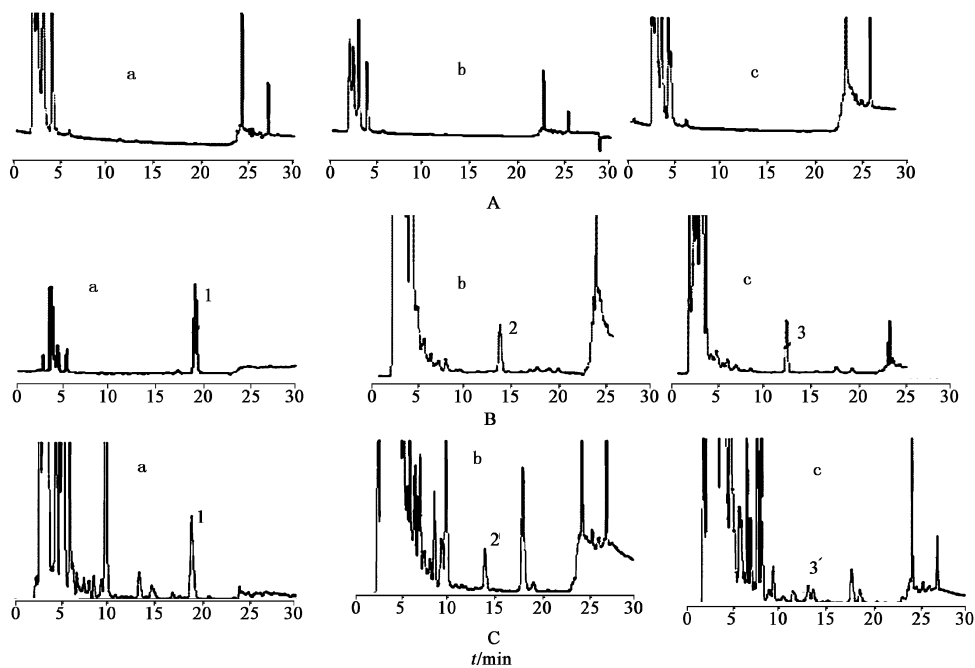
**2.2.3 样品的预处理** 尿液预处理：分别取空白、给药后各时间段的尿样各2 mL，加2倍量乙酸乙酯涡旋振荡萃取，4 500 r·min<sup>-1</sup>离心10 min，取乙酸乙酯层，氮气吹干，500 μL甲醇溶解，10 000 r·min<sup>-1</sup>高速离心，取上清液即得。

粪样预处理：将收集的粪样研细，分别取空白、给药后各时间段粪样各0.5 g，加10倍水研磨均匀，4 500 r·min<sup>-1</sup>离心10 min，取上清液加2倍量乙酸乙酯涡旋振荡萃取，合并乙酸乙酯层，氮气吹干，500 μL甲醇溶解，10 000 r·min<sup>-1</sup>高速离心，取上清液即得。

**2.2.4 SFE部位灌胃给药的排泄动力学研究** 选取健康SD大鼠6只，体重(290 ± 10) g，分别置于代谢笼中，实验前禁食(不禁水)12 h，收集空白粪便和尿液。按40 g·kg<sup>-1</sup>剂量灌胃给药，收集给药后0~4, 4~8, 8~12, 12~24, 24~48, 48~60, 60~72, 72~84, 84~96 h时间段的尿液和粪便。准确记录所收集尿液的体积；收集到的各时间段粪样精密记录晾干后的质量，置于-20 °C保存。

## 3 结果

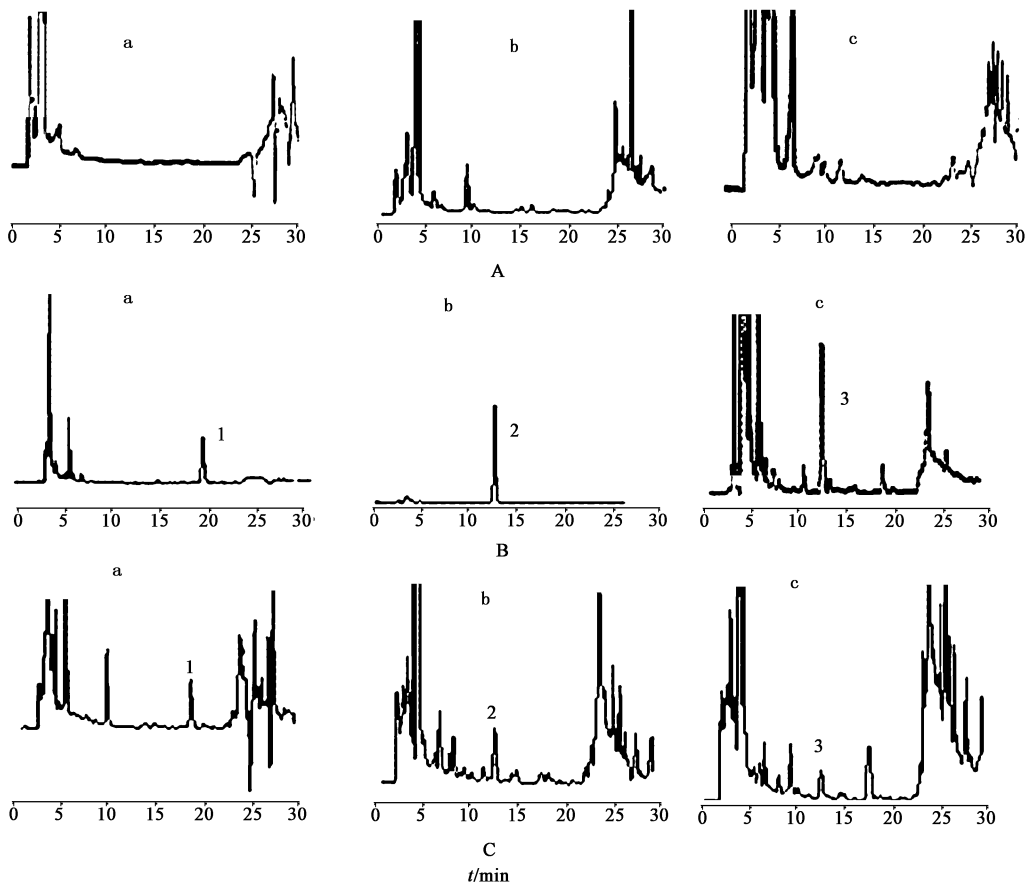
**3.1 方法专属性考察** 取大鼠空白尿液、粪样，按2.2.3项下“样品预处理”方法处理样品，按2.1项下色谱条件进样分析，获得空白样品色谱图；将配制一定浓度的LT, NBP, SA标准溶液加入空白尿液和粪样中，依同法操作，获得相应的色谱图，取大鼠给药后的尿液和粪样，依法操作，得相应的色谱图。实验结果表明，尿液和粪样中的内源性物质不干扰LT, NBP和SA的测定，见图1~2。



A. 空白尿液; B. 加入对照品尿液; C. 给药尿样; a. 328 nm; b. 228 nm; c. 280 nm; 1. LT; 2. NBP; 3. SA; 3'. 未知物

图 1 芎藭汤大鼠尿样色谱

Fig.1 Chromatography of urine sample in rat



A. 空白粪样; B. 加入对照品粪样; C. 给药粪样; a. 328 nm; b. 228 nm; c. 280 nm; 1. LT; 2. NBP; 3. SA

图 2 芎藭汤大鼠粪样色谱

Fig.2 Chromatography of feces sample in rat

**3.2 线性关系及最低定量限测定** 大鼠尿液:在大鼠空白尿液中分别加入不同浓度的 LT,NBP 系列对照品溶液,按照 2.2.3 项下尿液预处理方法操作,作 HPLC 分析。以质量浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,求得直线回归方程分别为  $Y = 13.263X + 5.3418, r = 0.9998$ ;  $Y = 33.219X + 25.318, r = 0.9994$ 。结果显示大鼠尿液中 LT,NBP 质量浓度分别在  $0.624 \sim 49.92, 0.63 \sim 50.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  线性关系良好,最低定量限分别为  $0.624, 0.63 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

大鼠粪便:方法同大鼠尿液,LT,SA 线性回归方程为  $Y = 17.384X - 2.4572, r = 1.000$ ;  $Y = 12.203X - 10.490, r = 0.9999$ 。大鼠粪便中 LT,SA 浓度分别在  $0.78 \sim 46.8, 3.135 \sim 186 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  线性关系良好,最低定量限分别为  $0.78, 3.135 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**3.3 提取回收率** 取大鼠空白尿液 1 mL(粪样 0.1 g),按 3.2 项下线性关系考察项下的处理方法制备低、中、高 3 个浓度的样品,每个浓度进行 5 个样本分析。残留物以 500  $\mu\text{L}$  初始流动相溶解。另取空白尿液(粪样),按 2.2.3 项下尿液和粪样预处理方法操作,离心后获得上清液,加入与上述相应浓度的标准溶液(每个浓度进行 5 样本分析),氮气吹干,残留物以 500  $\mu\text{L}$  初始流动相溶解,取 20  $\mu\text{L}$  以进行 HPLC 分析,获得相应 LT,SA,NBP 峰面积值,以每一浓度的 2 种处理方法的峰面积比值计算提取回收率,见表 1。

**3.4 精密度** 按 3.2 项下线性关系考察项下的处理方法制备低、中、高 3 个浓度的样品,每浓度 3 个样品,于开始测定的 1,7,14 h 分别对各浓度 3 个样品进行测试,求得日内精密度,连续测定 3 d,求得日间精密度。日内及日间精密度 RSD 均  $< 3\%$ ,表明该方法

表 1 大鼠给药后尿液、粪样提取回收率实验结果( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Results of extraction recovery( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

样品	成分	质量浓度	回收率	RSD
		/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	/%	/%
尿液	LT	1.25	$88.90 \pm 0.01$	1.2
		24.96	$88.80 \pm 0.01$	1.6
		49.92	$90.59 \pm 0.01$	1.2
	NBP	1.26	$89.89 \pm 0.02$	1.8
		12.60	$90.23 \pm 0.01$	1.2
		50.40	$93.40 \pm 0.01$	1.2
粪样	LT	1.56	$87.00 \pm 0.01$	1.4
		15.60	$91.11 \pm 0.01$	1.4
		46.80	$93.90 \pm 0.01$	1.4
	SA	6.27	$89.99 \pm 0.02$	1.8
		31.35	$91.09 \pm 0.02$	1.7
		186.00	$91.87 \pm 0.01$	1.0

精密度良好。

**3.5 室温稳定性和冻融稳定性** 取大鼠空白尿液、粪样,按照 3.2 项下线性关系考察项下的处理方法配成高、中、低 3 组浓度的样品,各 3 个样本,各组浓度同精密度项下浓度。在室温下放置,分别在 0,4,8,12,16,24 h 进行 HPLC 测定,并于 0,3,5,10 d 进行 HPLC 测定,记录不同浓度样品峰面积。室温稳定性和冻融稳定性 RSD 均  $< 3\%$ ,表明大鼠尿液、粪样样品在室温放置 24 h 内稳定,在冻融条件下放置 10 d 内稳定。

**3.6 SFE 部位灌胃给药后排泄动力学** 大鼠灌胃给药剂量 LT,NBP,SA 分别为  $(58812 \pm 89.27)(8809 \pm 33.44)(2709 \pm 411.19) \mu\text{g}$ 。尿液、粪样排泄动力学结果,见表 2~3。

表 2 LT,NBP 大鼠尿液排泄动力学结果( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Urine excretion kinetics results of LT, NBP in rat( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

时间段 /h	LT			NBP		
	排泄量	累积排泄量	累积排泄率	排泄量	累积排泄量	累积排泄率
	/ $\mu\text{g}$	/ $\mu\text{g}$	/%	/ $\mu\text{g}$	/ $\mu\text{g}$	/%
0~4	$12.26 \pm 0.57$	$12.26 \pm 2.61$	$0.021 \pm 0.001$	$6.64 \pm 0.71$	$6.64 \pm 1.54$	$0.075 \pm 0.032$
4~8	$9.81 \pm 0.50$	$22.07 \pm 3.77$	$0.038 \pm 0.001$	$7.29 \pm 0.58$	$13.93 \pm 2.21$	$0.158 \pm 0.028$
8~12	$16.11 \pm 1.57$	$38.17 \pm 7.28$	$0.065 \pm 0.002$	$14.26 \pm 1.40$	$28.19 \pm 3.65$	$0.320 \pm 0.054$
12~24	$72.47 \pm 1.67$	$110.70 \pm 5.75$	$0.188 \pm 0.040$	$85.55 \pm 2.63$	$113.70 \pm 6.72$	$1.291 \pm 0.967$
24~36	$34.13 \pm 1.40$	$144.80 \pm 5.48$	$0.246 \pm 0.015$	$82.12 \pm 5.69$	$195.90 \pm 13.85$	$2.224 \pm 1.095$
36~48	$24.65 \pm 1.45$	$169.40 \pm 5.54$	$0.288 \pm 0.022$	$35.12 \pm 1.90$	$231.00 \pm 7.21$	$2.622 \pm 0.502$
48~60	$2.17 \pm 0.76$	$171.60 \pm 5.25$	$0.292 \pm 0.026$	$2.38 \pm 0.33$	$233.40 \pm 6.86$	$2.650 \pm 0.837$
60~72	$1.05 \pm 0.30$	$172.6 \pm 8.88$	$0.294 \pm 0.031$	$1.99 \pm 0.42$	$235.40 \pm 6.95$	$2.672 \pm 0.851$
72~84	$0.24 \pm 0.12$	$172.90 \pm 8.28$	$0.294 \pm 0.036$	$0.89 \pm 0.33$	$236.30 \pm 10.53$	$2.682 \pm 0.424$
84~96	$0 \pm 0$	$172.90 \pm 8.28$	$0.294 \pm 0.036$	$0 \pm 0$	$236.30 \pm 10.53$	$2.682 \pm 0.424$

表 3 LT, SA 大鼠粪样排泄动力学结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Feces excretion kinetics results of LT, SA in rat ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

时间段/h	LT			SA		
	排泄量 /μg	累积排泄量 /μg	累积排泄率 /%	排泄量 /μg	累积排泄量 /μg	累积排泄率 /%
0~4	0.10 ± 0.08	0.10 ± 0.05	0.000 2 ± 0.000 1	2.15 ± 1.12	2.15 ± 1.12	0.000 1 ± 0.004 9
4~8	1.84 ± 0.14	1.94 ± 0.55	0.003 3 ± 0.000 4	5.23 ± 1.24	7.38 ± 5.32	0.027 2 ± 0.016 3
8~12	11.76 ± 1.30	13.70 ± 2.12	0.023 3 ± 0.002 4	52.19 ± 4.29	59.57 ± 12.46	0.219 9 ± 0.071 0
12~24	17.94 ± 1.46	31.64 ± 5.54	0.053 8 ± 0.002 9	79.0 ± 7.89	138.59 ± 11.97	0.511 5 ± 0.094 7
24~36	15.20 ± 1.44	46.84 ± 5.52	0.080 0 ± 0.002 0	79.91 ± 4.40	218.50 ± 16.64	0.806 5 ± 0.180 0
36~48	59.25 ± 3.26	106.09 ± 6.12	0.180 3 ± 0.040 4	146.22 ± 5.96	364.72 ± 18.22	1.346 1 ± 0.219 0
48~60	7.08 ± 1.20	113.17 ± 5.28	0.192 4 ± 0.020 8	50.54 ± 4.73	415.26 ± 21.06	1.532 7 ± 0.192 0
60~72	1.46 ± 0.53	114.63 ± 4.61	0.194 9 ± 0.090 0	23.05 ± 2.07	438.31 ± 18.40	1.617 7 ± 0.174 0
72~84	0.69 ± 0.27	115.32 ± 4.35	0.196 1 ± 0.029 0	14.49 ± 2.88	452.80 ± 23.29	1.671 2 ± 0.308 0
84~96	0 ± 0	115.32 ± 4.35	0.196 1 ± 0.029 0	10.16 ± 2.77	462.96 ± 19.10	1.708 7 ± 0.212 0

## 4 讨论

4.1 大鼠给予芎藭汤 SFE 部位后,在尿液中检测到 LT, NBP, 未检出 SA, 在 SA 相同保留时间处出现一新物质, 紫外最大吸收波长为 295 nm, 与 SA ( $\lambda_{\max}$  280 nm) 不一致, 其结构分析有待于进一步实验研究。在粪样中检测到 LT 和 SA, 在本实验检测限范围内未检测到 NBP。

4.2 根据 SFE 部位含量测定结果及给药剂量, 计算出各成分的排泄率, SA 总排出量占给药量的 1.71%, NBP 排出量占给药量的 2.68%, LT 总排出量占给药量的 0.49%, 说明此 3 种物质可能在体内转化为其他物质。

4.3 实验中 NBP 尿排泄率为 2.68%, 与文献[6]测得的 72 h 内 NBP 尿排泄率为 2.5% 近似。较之于其他 2 种成分, 芎藭汤中 NBP 以原型形式排泄出体外的量更高。

## [参考文献]

- [1] 林乔, 赵爱国, 陈建南, 等. 藁本内酯的镇痛抗炎作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 165-168.
- [2] 闫升, 乔国芳, 刘志峰, 等. 当归油对大鼠离体子宫平滑肌收缩功能的影响[J]. 中草药, 2000, 31(8): 604-605.
- [3] 高伟, 梁日欣, 肖永庆, 等. 川芎内酯 A 预处理对大鼠离体心脏缺血再灌注所致血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(18): 1448-1451.
- [4] 徐皓亮, 冯亦璞. 丁基苯酞对大鼠血栓形成及血小板功能的影响[J]. 药学学报, 2001, 36(5): 329-333.
- [5] 李磊, 容蓉, 杨勇, 等. 芎藭汤不同极性部位抗小鼠急性心肌缺血的实验研究[J]. 齐鲁药事, 2009, 28(4): 238-241.
- [6] 王春华, 冯亦璞. 丁基苯酞在大鼠中代谢产物的研究[J]. 药学学报, 1997, 32(9): 641-646.

[责任编辑 邹晓翠]