

· 药物代谢 ·

血府逐瘀汤中芍药苷在大鼠体内的药代动力学特性

黄巍¹, 熊伟², 唐灿^{2*}, 毛旭华², 张丰华¹

(1. 成都中医药大学, 成都 611137; 2. 成都岐黄康健生物科技有限公司, 成都 611130)

[摘要] 目的:研究血府逐瘀汤中芍药苷在大鼠体内的药代动力学特性。方法:采用 HPLC 测定大鼠血清中芍药苷含量, Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 流动相乙腈-水(16:84), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 230 nm, 进样量 20 μL, 以核黄素为内标物。结果:芍药苷质量浓度在 0.01 ~ 1.0 mg·L⁻¹ 线性关系良好。定量限 0.01 mg·L⁻¹。平均日内、日间精密度分别为 3.3%, 3.9%, 平均回收率 101.3%。大鼠灌胃血府逐瘀汤后芍药苷的药峰浓度(C_{max}) (0.363 ± 0.080) mg·L⁻¹, 达峰时间(T_{max}) (0.276 ± 0.084) h, 吸收速率常数(K_a) (30.905 ± 10.114) h⁻¹, 末端消除速率(K_e) (1.638 ± 0.181) h⁻¹, 半衰期($t_{1/2}$) (0.501 ± 0.038) h, 清除率/绝对生物利用度(CL/F) (69.846 ± 4.624) L·h⁻¹·kg⁻¹, 表观分布容积/绝对生物利用度(V_z/F) (36.521 ± 12.287) L·kg⁻¹, 药时曲线下面积(AUC_{0-t}) (0.356 ± 0.024) mg·L⁻¹·h。结论:血府逐瘀汤中芍药苷在大鼠体内具有吸收速率快、分布容积大、生物半衰期短的药代动力学特性, 为研究药物配伍对芍药苷药动学的影响和血府逐瘀汤发挥药效的作用机制提供参考。

[关键词] 血府逐瘀汤; 芍药苷; 药代动力学; 核黄素

[中图分类号] R969.1; R945; R284.1; R944.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)15-0084-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015150084

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150610.0942.004.html>

[网络出版时间] 2015-06-10 9:42

Pharmacokinetic Characteristics on Paeoniflorin in Xuefu Zhuyu Tang in Rats HUANG Wei¹, XIONG Wei², TANG Can^{2*}, MAO Xu-hua², ZHANG Feng-hua¹ (1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Chengdu Qihuang Kangjian Bio-technology Co. Ltd., Chengdu 611130, China)

[Abstract] **Objective:** To study pharmacokinetic characteristics on paeoniflorin in Xuefu Zhuyu Tang in rats. **Method:** The paeoniflorin content in serum of rats was determined by HPLC. Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was adopted and eluted with the mobile phase of acetonitrile-water (16:84). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the temperature of column was 30 °C, the detection wavelength was 230 nm, and the sample size was 20 μL with riboflavin as the internal standard. **Result:** The linear relationship was good with the paeoniflorin concentration at 0.01-1.0 mg·L⁻¹. The limit of quantitation was 0.01 mg·L⁻¹. The average intra-day precision was 3.3%, while the average inter-days precision was 3.9%, the average recovery rate was 101.3%. After rats were administered with Xuefu Zhuyu Tang, the peak concentration of paeoniflorin was (0.363 ± 0.080) mg·L⁻¹, with T_{max} of (0.276 ± 0.084) h, K_a of (30.905 ± 10.114) h⁻¹, K_e of (1.638 ± 0.181) h⁻¹, $t_{1/2}$ of (0.501 ± 0.038) h, CL/F of (69.846 ± 4.624) L·h⁻¹·kg⁻¹, V_z/F of (36.521 ± 12.287) L·kg⁻¹ and AUC_{0-t} of (0.356 ± 0.024) mg·L⁻¹·h. **Conclusion:** Paeoniflorin in Xuefu Zhuyu Tang is rapidly absorbed, distributed in a large volume and short in half-life, this study can provide a reference for studying effect of compatibility on paeoniflorin's pharmacokinetics and efficacy of Xuefu Zhuyu Tang.

[Key words] Xuefu Zhuyu Tang; paeoniflorin; pharmacokinetics; riboflavin

[收稿日期] 20141113(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102554)

[第一作者] 黄巍, 博士, 副教授, 从事中药方剂配伍理论研究, Tel:13088090962, E-mail:gracehw@126.com

[通讯作者] *唐灿, 博士, 副教授, 从事药理学研究, Tel:13880461058, E-mail:cancan74w@126.com

血府逐瘀汤源自《医林改错》^[1],由当归 9 g,地黄 9 g,桃仁 12 g,红花 9 g,枳壳 6 g,赤芍 6 g,柴胡 3 g,甘草 3 g,桔梗 4.5 g,川芎 4.5 g,牛膝 9 g 共 11 味中药组成,具有活血化瘀、行气止痛之功效,主治胸中血瘀证。方中药味众多,化学成分复杂^[2],但未见其药代动力学研究报道^[3-6]。复方所含药物在体内的吸收、分布、代谢和排泄过程受众多因素的影响,如药物的相互作用、动物种属、动物个体差异等。目前要完整、全面地研究复方中每一味药物的药代动力学特性还难以实现,但可对复方中代表性成分的药代动力学进行研究。文献报道芍药苷具有抑制血小板聚集、扩张血管等药理作用^[7-8],与血府逐瘀汤的功效一致,故选择芍药苷为指标成分。本实验采用 HPLC 测定大鼠灌胃血府逐瘀汤后芍药苷的血药浓度,分析芍药苷在大鼠体内的药代动力学特性,为该复方的临床应用提供参考。

1 材料

SPD-10Avp 型紫外-可见光检测器和 LC-10ATvp 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),N2000 色谱工作站(浙江大学智能信息研究所),FA1004 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司),LG15-W 型高速微量离心机(北京医用离心机厂)。11 味药材均购自四川本草堂药业,经成都中医药大学张廷模教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》相关项下要求。芍药苷对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号 121207,纯度 $\geq 98\%$),核黄素对照品(成都植标化纯生物技术有限公司,批号 130114,纯度 $>98\%$),甲醇、乙腈为色谱纯,水为注射用水。

SD 大鼠 6 只,SPF 级,雌雄各半,体重 180 ~ 220 g,购自四川省中医药科学院,合格证号 SCXK(川)2013-19。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 30 °C,流动相乙腈-水(16:84),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 230 nm,进样量 20 μL。核黄素为内标物。

2.2 药液制备 按处方比例称取 45 倍处方量药材,加 10 倍量水浸泡 30 min,煎煮 3 次,每次 30 min,合并煎液,过滤,滤液转移至旋转蒸发器浓缩 8 h,真空干燥^[9-10],得血府逐瘀汤提取物粉末(过 60 目筛)426 g。计算芍药苷质量分数 2.290 mg·g⁻¹。称取该提取物粉末 4.0 g,加水 4.0 mL,搅拌使完全溶解,得药液。

2.3 溶液配制 精密称取芍药苷对照品 6.63 mg,

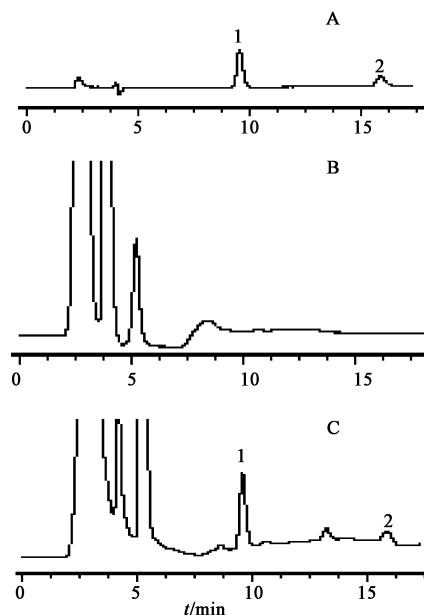
置于 50 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,得对照品储备溶液;取该储备溶液适量,用水稀释至 1.0 mg·L⁻¹,得芍药苷对照品溶液。精密称取核黄素对照品 4.8 mg 于 50 mL 棕色量瓶中,加 70% 甲醇溶解并定容,摇匀,得储备液;取该储备液适量,用水稀释 60 倍,得 1.57 mg·L⁻¹ 内标工作液。

2.4 给药及采血 血府逐瘀汤药液按 5 mL·kg⁻¹ 灌胃,以芍药苷计算灌胃剂量 11.452 mg·kg⁻¹。灌胃后分别于 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 120, 240 min 眼眶静脉丛取血。

2.5 血清样品处理 采血后,静置,离心(5 000 r·min⁻¹, 10 min, 下同),取血清 100 μL,加入乙腈 250 μL 和内标工作液 20 μL,旋涡,离心,转移上清液,40 °C 水浴通氮吹干,加水 100 μL 复溶。

2.6 方法学考察

2.6.1 专属性 取芍药苷对照品溶液加内标工作液、空白血清样品、给药后血清样品溶液加内标物适量,按 2.1 项下条件测定,见图 1。结果显示芍药苷和内标物核黄素、血清中内源性杂质的分离度良好,核黄素、芍药苷保留时间分别约为 9.5, 15.8 min。



A. 对照品 + 核黄素; B. 空白血清; C. 给药血清 + 内标物; 1. 核黄素; 2. 芍药苷

图 1 血府逐瘀汤 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Xuefu Zhuyu Tang

2.6.2 精密度 取芍药苷对照品溶液和内标工作液适量,加水稀释,旋涡混匀,按 2.1 项下条件连续进样 6 次,计算核黄素、芍药苷峰面积的 RSD 分别为 1.0%, 0.3%, 表明仪器精密度良好。

2.6.3 线性范围 取空白血清 100 μL , 精密加入芍药苷对照品溶液适量和内标工作液各 20 μL , 加入乙腈 250 μL 沉淀蛋白。按 2.5 项下方法操作, 制得含芍药苷质量浓度分别为 0.01, 0.02, 0.06, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列空白血清样品溶液, 按 2.1 项下条件测定, 以质量浓度为横坐标, 芍药苷和核黄素峰面积之比为纵坐标, 得回归方程 $Y=1.8925X+0.0029$ ($r=0.9996$), 线性范围 0.01 ~ 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 定量限质量浓度 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.6.4 日内日间精密度 按 2.5 项下方法操作, 制得含芍药苷质量浓度分别为 0.01, 0.1, 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的低、中、高质量浓度空白血清样品溶液 ($n=5$), 按 2.1 项下条件连续测定 3 d。结果含低、中、高质量浓度芍药苷的空白血清样品日内精密度分别为 3.4%, 3.2%, 3.2%; 日间精密度分别为 4.2%, 3.1%, 4.4%。

2.6.5 回收率 取 2.6.4 项下低、中、高质量浓度的血清样品溶液, 按 2.1 项下条件测定, 计算样品回收率分别为 102.5%, 101.3%, 100.0%, RSD 分别为 0.8%, 0.9%, 0.4%。

2.6.6 稳定性 按 2.5 项下方法操作, 制得含芍药苷质量浓度分别为 0.01, 0.1, 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的低、中、高质量浓度空白血清样品溶液 ($n=4$), 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

冰箱中, 避光, 长期放置。分别于第 0, 3, 7, 15 天检测 1 份, 考察长期冷冻放置稳定性, 结果 7 d 内芍药苷峰面积的 RSD 分别为 0.4%, 0.9%, 1.2%, 说明血清样品溶液在 7 d 内稳定。

2.7 药代动力学研究 6 只大鼠灌胃血府逐瘀汤, 按 2.4 项下方法给药和采血, 按 2.5 项下方法操作, 按 2.1 项下条件测定, 计算血清中芍药苷浓度, 见图 2。将药-时曲线数据输入 DAS2.0 软件, 计算药代动力学参数, 结果见表 1。

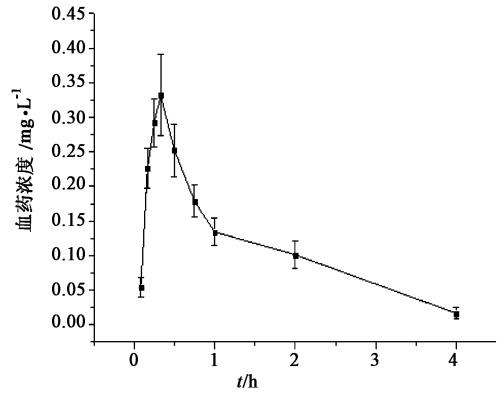


图 2 血府逐瘀汤灌胃给药后大鼠血浆中芍药苷平均药-时曲线 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 2 Average concentration-time curve of paeoniflorin in plasma of rats after intragastric administration of Xuefu Zhuyu Tang ($\bar{x}\pm s, n=6$)

表 1 血府逐瘀汤灌胃给药后大鼠血浆中芍药苷药代动力学参数 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of paeoniflorin in plasma of rats after intragastric administration of Xuefu Zhuyu Tang ($\bar{x}\pm s, n=6$)

房室模型			统计矩		
参数	单位	数据	参数	单位	数据
$t_{1/2}$	h	0.501 \pm 0.038	AUC_{0-t}	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$	0.408 \pm 0.092
K_e	h	1.638 \pm 0.181	$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$	0.451 \pm 0.057
V_z/F	$\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	36.521 \pm 12.287	$t_{1/2z}$	h	0.724 \pm 0.036
CL/F	$\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	69.846 \pm 4.624	T_{max}	h	0.276 \pm 0.084
AUC_{0-t}	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	0.356 \pm 0.024	CL_z/F	$\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	67.017 \pm 9.726
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	0.381 \pm 0.022	V_1/F	$\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	41.972 \pm 5.756
K_a	h	30.905 \pm 10.114	C_{max}	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.363 \pm 0.080

3 讨论

血府逐瘀汤由 11 味药材组成, 化学成分复杂, 含量各异, 方中有效成分主要有苦杏仁苷、柚皮苷、阿魏酸、川芎嗪、芍药苷等。这些单个有效成分的分析方法多采用 HPLC, 文献报道较多。前期研究发现血府逐瘀汤中芍药苷含量较高, 大鼠血浆中也仅芍药苷能使用 HPLC 进行定量分析。在复方中芍药苷的血浆浓度 HPLC 测定文献报道中, 血浆样品的

处理方法有萃取法、吸附法、沉淀蛋白法等。本文采用乙腈沉淀蛋白法, 简便快速。流动相考察了乙腈-水、乙腈-酸水、乙腈-缓冲盐体系, 结果发现仅当选择乙腈-水 (16:84) 时, 芍药苷出峰不受影响。

关于芍药苷单体及单方中芍药苷在大鼠体内的药动学已有报道, 按 2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给予芍药苷单体, 约 10 min 后, 血药浓度 32.7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 至 240 min 仅 0.7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 半衰期 ($t_{1/2}$) (40.2 \pm 6.1) min^[11];

大鼠按剂量 $265 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以芍药苷计) 单独灌胃赤芍煎液后, 芍药苷在体内的达峰时间 (T_{\max}) 45 min , 药峰浓度 (C_{\max}) $13.68 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $t_{1/2}$ 约 2.5 h ^[12]。本文大鼠按剂量 $11.452 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以芍药苷计) 灌胃给予血府逐瘀汤, 药代动力学模型符合一室模型, T_{\max} 较灌胃芍药苷单体长, $t_{1/2}$ 和灌胃芍药苷单体接近; T_{\max} 较灌胃赤芍单方短, $t_{1/2}$ 远小于灌胃赤芍单方, 这种差异可能是由灌胃剂量的不同或药物的配伍作用引起。

大鼠灌胃给予血府逐瘀汤后, 芍药苷表现分布容积/绝对生物利用度 (V_z/F) 大于大鼠体液体积 $0.18 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$, 这与弱碱性药物分布容积大的特点一致; T_{\max} 短, C_{\max} 低, 说明芍药苷灌胃吸收速率快、吸收程度低, 提示芍药苷可能主要经上消化道吸收, 对芍药苷制剂的开发和给药具有一定的指导意义。

[参考文献]

[1] 王清任. 医林改错. 上卷[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2011: 13-16.
[2] 孙明谦, 卢健秋, 张宏桂. 液质联用技术分析血府逐瘀汤中的化学成分[J]. 中成药, 2009, 31(5): 793-794.
[3] 李辉, 任平, 黄熙, 等. 高效液相色谱法同时测定健康人口服加味逍遥散后血清阿魏酸和芍药苷含量及其

药动学研究[J]. 中西医结合学报, 2008, 6(11): 1178-1183.

[4] 项琪, 程刚, 汤洁, 等. 白芍煎剂在大鼠体内的药代动力学[J]. 沈阳药科大学学报, 1999, 4(16): 1-5.
[5] 鲁建武, 宋金春, 马俊玲, 等. 当归芍药散提取液中芍药苷和阿魏酸在大鼠体内的血浓度测定[J]. 中国药师, 2010, 13(11): 1575-1580.
[6] 闫寒, 付衍, 彭娟, 等. 大鼠含药血清中芍药苷的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 89-91.
[7] 翁小刚, 聂淑琴, 黄璐琦. 芍药科植物的研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(1): 55-59.
[8] 刘东锋, 张莉, 陈婷. 四逆散有效成分芍药苷药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(2): 36-38.
[9] 孙丽荣, 严华成, 曹雄, 等. 煎煮时间和煎煮次数对三种芍药汤剂中芍药苷含量的影响[J]. 中国药物与临床, 2008, 8(9): 693-695.
[10] 晏星, 袁小红, 刘卓, 等. 不同干燥方法对附子提取物中双酯型生物碱的影响[J]. 中药材, 2012, 35(2): 204-205.
[11] 杨秀伟. 中药成分代谢分析[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 268.
[12] 邓晶晶. 复方中药赤丹丸中芍药苷的药动学研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2011.

[责任编辑 刘德文]