

· 药物代谢 ·

## 洋川芎内酯 I 在大鼠尿液和胆汁中的排泄

马聪<sup>1</sup>, 熊耀坤<sup>2</sup>, 马诗瑜<sup>3</sup>, 富臻<sup>1</sup>, 李俊<sup>1</sup>, 梁爽<sup>1</sup>, 冯怡<sup>1\*</sup>

(1. 上海中医药大学 中药现代制剂技术教育部工程中心, 上海 201203;  
2. 江西中医药大学, 南昌 330004; 3. 上海中医药大学 中药学院, 上海 201203)

**[摘要]** 目的:研究洋川芎内酯 I 在灌胃和静脉注射后在大鼠体尿液和胆汁中的排泄特征,为该成分的临床前研究和评价提供参考。方法:大鼠按剂量  $72 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃和尾静脉给与洋川芎内酯 I 溶液,收集不同时间段尿液和胆汁,采用高效液相色谱-紫外检测器法(HPLC-VWD)测定大鼠尿液和胆汁中洋川芎内酯 I 的含量,检测波长均为 278 nm,流动相均为乙腈-0.1% 甲酸水溶液梯度洗脱。结果:灌胃和尾静脉给药 48 h 后累积经尿液排泄的原形药物量分别为  $(179.8 \pm 33.68)$ ,  $(264.8 \pm 87.28) \mu\text{g}$ ,累积排泄率分别为  $(0.77 \pm 0.15)\%$  和  $(1.35 \pm 0.26)\%$ ;给药 36 h 后累积经胆汁排泄的原形药物量依次为  $(359.4 \pm 75.66)$ ,  $(426.3 \pm 140.90) \mu\text{g}$ ,累积排泄率分别为  $(1.22 \pm 0.49)\%$  和  $(1.72 \pm 0.59)\%$ 。结论:洋川芎内酯 I 在大鼠尿液和胆汁内以原形药物的形式排出量较少,且排泄迅速。

**[关键词]** 洋川芎内酯 I; 累积排泄率; 尿液; 胆汁; 川芎

**[中图分类号]** R969.1;R945;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)19-0075-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015190075

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150824.0958.008.html>

**[网络出版时间]** 2015-08-24 9:58

**Urine and Bile Excretion of Senkyunolide I in Rats** MA Cong<sup>1</sup>, XIONG Yao-kun<sup>2</sup>, MA Shi-yu<sup>3</sup>, FU Zhen<sup>1</sup>, LI Jun<sup>1</sup>, LIANG Shuang<sup>1</sup>, FENG Yi<sup>1\*</sup> (1. *Engineering Research Center of Modern Preparation Technology of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China*; 2. *Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China*; 3. *School of Chinese Materia Medica, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To study excretion characteristics of senkyunolide I in urine and bile by intravenous injection and intragastric administration, respectively. **Method:** Rats were intravenous injected and intragastric administrated with senkyunolide I at a dose of  $72 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , respectively. The urine and bile were collected at different time points. The concentrations of senkyunolide I in urine and bile were measured by HPLC-VWD, detection wavelength was set at 278 nm, mobile phase consisted of acetonitril-water (containing 0.1% formic acid) for gradient elution. **Result:** After intragastric administration and intravenous injection, cumulative excretion of senkyunolide I in 48 h were  $(179.8 \pm 33.68)$ ,  $(264.8 \pm 87.28) \mu\text{g}$  in urine, cumulative excretion percentages were calculated to be  $(0.77 \pm 0.15)\%$  and  $(1.35 \pm 0.26)\%$ , respectively; cumulative excretion of senkyunolide I in 36 h were  $(359.4 \pm 75.66)$ ,  $(426.3 \pm 140.90) \mu\text{g}$  in bile, cumulative excretion percentages were calculated to be  $(1.22 \pm 0.49)\%$  and  $(1.72 \pm 0.59)\%$ , respectively. **Conclusion:** Prototype is not main elimination form of senkyunolide I in rats' urine and bile, its speed of excretion is fast.

**[Key words]** senkyunolide I; cumulative excretion; urine; bile; Chuanxiong Rhizoma

**[收稿日期]** 20150312(017)

**[基金项目]** 国家教育部科学技术研究重点项目(211060);国家教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(20123107120009)

**[第一作者]** 马聪, 硕士, 从事药物代谢动力学研究, Tel:18817939751, E-mail:443697896@qq.com

**[通讯作者]** \* 冯怡, 博士, 教授, 从事中药制剂研究, Tel:021-51322491, E-mail:fyi\_shutem@163.com

川芎有行血、祛瘀和祛风止痛等功效,其主要化学成分包括苯酞内酯类化合物、萜类成分及阿魏酸等。现代药理研究发现,部分川芎内酯类化合物能够通过血脑屏障,且还具有扩张血管、抗血小板聚集、增加脑血流量、保护脑损伤等作用<sup>[1-4]</sup>。洋川芎内酯 I 是川芎水煎液中最主要的活性成分之一<sup>[5-6]</sup>, 体内外均可由藁本内酯转变而成<sup>[7]</sup>。前期研究发现洋川芎内酯 I 具有较好的水溶性和脂溶性,体内研究表明其既可以入脑又可以入血<sup>[8]</sup>。在对其大鼠体内药物代谢动力学研究中,发现洋川芎内酯 I 在大鼠体内吸收迅速、半衰期短,在血液中消除快,口服绝对生物利用度约 37.25%<sup>[9-10]</sup>。在大鼠体内的代谢研究中发现洋川芎内酯 I 代谢途径较多,其中葡萄糖醛酸结合和谷胱甘肽结合可能为主要的 2 种代谢途径<sup>[11]</sup>,但目前关于该成分体内排泄过程的研究很少。本实验拟建立 HPLC 测定大鼠尿液和胆汁中洋川芎内酯 I 含量的方法,研究该成分经灌胃和尾静脉注射给药后在尿液和胆汁中的排泄动力学,以完善洋川芎内酯 I 在体内的过程研究,为该成分的临床前研究和评价提供实验依据。

## 1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), XW-80A 型旋涡混合器(上海精科实业有限公司), N-EVAAP-111 型氮吹仪(美国 Organomation 公司), TGL-18c 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂), FA2104N 型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司), Super-Q Plus 型超纯水器(美国 Millipore 公司)。洋川芎内酯 I 对照品(自制,经 HPLC 测得纯度  $\geq 98\%$ ), 牛蒡苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110819-201309), 甲醇、乙腈为色谱纯,水为自制超纯水,其余试剂均为分析纯。

健康 SD 大鼠 24 只,体重 270 ~ 300 g,上海中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(沪) 2014-0008。

## 2 方法和结果

**2.1 色谱条件** Sepax GP-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 检测波长 278 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 20 μL。尿液、胆汁样品中洋川芎内酯 I 检测的流动相分别为乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 2 min, 4% A; 2 ~ 4 min, 4% ~ 12% A; 4 ~ 45 min, 12% ~ 31% A; 45 ~ 47 min, 31% ~ 4% A; 47 ~ 49 min, 4% A), 乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 2 min, 4% A; 2 ~ 4 min, 4% ~ 12% A; 4 ~ 35 min, 12% ~ 31% A; 35 ~

37 min, 31% ~ 4% A; 37 ~ 39 min, 4% A)。

**2.2 溶液的配制** 精密称取洋川芎内酯 I 对照品适量,置于 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释到刻度,摇匀,得 1.0 g·L<sup>-1</sup> 储备液,临用前用甲醇稀释成系列对照品溶液。精密称取牛蒡苷对照品适量,分别置于 2 个 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并制成质量浓度分别为 0.45, 0.15 g·L<sup>-1</sup> 的储备液。

**2.3 给药及样品的采集** 取健康雄性 SD 大鼠 12 只,随机分为 2 组,每组 6 只,置代谢笼中,实验前禁食 12 h,可自由饮水,并同时收集空白尿样,按剂量 72 mg·kg<sup>-1</sup> 分别灌胃和尾静脉注射给药,分别收集给药后 0 ~ 3, 3 ~ 6, 6 ~ 9, 9 ~ 12, 12 ~ 24, 24 ~ 36, 36 ~ 48 h 各时间段的尿样,记录各时间段尿液体积,尿液样品于 -20 °C 保存。取健康雄性 SD 大鼠 12 只,随机分为 2 组,每组 6 只,用乙醚麻醉后做胆管插管手术,结扎固定,收集胆汁,待稳定 10 min 后,收集空白胆汁,分别按剂量 72 mg·kg<sup>-1</sup> 灌胃和尾静脉注射给药,收集给药后 0 ~ 1, 1 ~ 2, 2 ~ 3, 3 ~ 4, 4 ~ 6, 6 ~ 8, 8 ~ 12, 12 ~ 24, 24 ~ 36 h 的胆汁,记录收集胆汁的体积,胆汁于 -20 °C 保存。

## 2.4 生物样品的处理

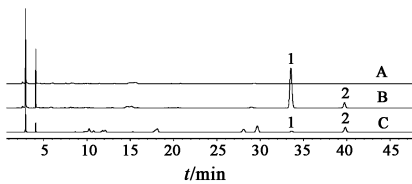
**2.4.1 尿液** 精密吸取大鼠尿液样品 100 μL,加入 0.15 g·L<sup>-1</sup> 牛蒡苷(内标物) 20 μL 和甲醇 400 μL,涡旋 1 min,于 12 000 r·min<sup>-1</sup> 高速离心 10 min,取上清液,用氮气吹干,加 4% 乙腈水溶液 100 μL 复溶,4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,吸取上清液进样分析。

**2.4.2 胆汁** 精密吸取大鼠胆汁样品 100 μL,加入 0.45 g·L<sup>-1</sup> 内标物溶液 20 μL 和甲醇 400 μL,按 2.4.1 项下方法处理。

## 2.5 方法学验证

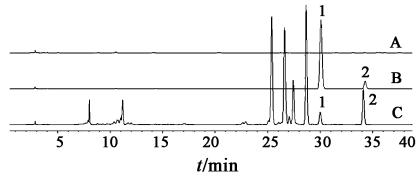
**2.5.1 专属性试验** 取大鼠空白尿液、含有洋川芎内酯 I 对照品和内标的空白尿液、给药后 3 h 大鼠尿液样品,按 2.4.1 项下方法处理,按 2.1 项下条件测定,见图 1。另取大鼠空白胆汁、含有洋川芎内酯 I 对照品和内标的空白胆汁、给药后 1 h 大鼠胆汁样品,按 2.4.2 项下方法处理,按 2.1 项下条件测定,见图 2。结果显示洋川芎内酯 I 和内标物在尿样中的保留时间分别约为 33.5, 39.7 min,在胆汁中的保留时间分别为 30.1, 34.3 min。相应物质色谱峰同相邻色谱峰之间分离效果较好,达到了分析要求。

**2.5.2 标准曲线和定量下限** 精密量取洋川芎内酯 I 对照品储备液,加甲醇稀释,得系列对照品溶液,精密吸取各对照品溶液适量,加入空白尿液 100 μL,



A. 空白尿液; B. 空白尿液 + 洋川芎内酯 I 对照品 + 内标物; C. 口服给药后 0~3 h 尿样 + 内标物; 1. 洋川芎内酯 I; 2. 牛蒡苷  
图 1 大鼠尿样 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of samples in rat urine



A. 空白胆汁; B. 空白胆汁 + 洋川芎内酯 I 对照品 + 内标物; C. 口服给药后 0~1 h 胆汁样品 + 内标物; 1. 洋川芎内酯 I; 2. 牛蒡苷  
图 2 大鼠胆汁 HPLC

Fig. 2 HPLC chromatograms of samples in rat bile

配成含量质量浓度 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  洋川芎内酯 I 对照品的尿液样品, 按 2.4.1 项下方法操作, 按 2.1 项下条件分析, 以质量浓度为横坐标, 洋川芎内酯 I 与内标物的峰面积比为纵坐标, 以加权最小二乘法进行线性回归运算, 得回归方程  $Y = 0.009 + 0.287X$  ( $r = 0.999$ ), 线性范围 0.20 ~ 20.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 最低定量限 0.20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。另将制备的系列对照品溶液加入空白胆汁中, 配成含有质量浓度 0.45, 0.9, 1.8, 9.0, 18.0, 36.0, 180.0, 360.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  洋川芎内酯 I 对照品的胆汁样品, 按 2.4.2 项下方法操作, 按 2.1 项下条件分析, 与尿液同法计算, 得回归方程  $Y = 0.005 + 0.064X$  ( $r = 0.998$ ), 线性范围 0.45 ~ 360  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 最低定量限 0.45  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.5.3 精密性与准确度** 取空白尿液, 各精密加入洋川芎内酯 I 对照品溶液适量, 配置低、中、高质量浓度分别为 0.4, 4.0, 16.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的尿液质量控制样品。按 2.4.1 项下方法处理, 按 2.1 项下条件测定, 每个分析批次平行测定 6 次, 连续测定 3 个分析批次, 计算准确度分别为 (92.44 ± 1.58)%, (89.71 ± 5.42)%, (92.02 ± 5.22)%, 日内精密 RSD 分别为 1.3%, 2.3%, 3.3%, 日间精密 RSD 依次为 4.8%, 5.8%, 6.8%。另取空白胆汁精密加入洋川芎内酯 I 对照品溶液适量, 配成洋川芎内酯 I 质量浓度 1.05, 21.0, 210  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的胆汁质量控制样品, 按 2.4.2 项下方法处理, 按 2.1 项下条件测

定, 同法计算准确度分别为 (106.1 ± 3.04)%, (109.0 ± 1.37)%, (100.0 ± 2.22)%, 日内精密 RSD 分别为 4.3%, 5.3%, 6.3%, 日间精密 RSD 分别为 7.8%, 8.8%, 9.8%。结果表明尿液和胆汁中洋川芎内酯 I 的测定方法均符合生物样本的分析要求。

**2.5.4 提取回收率** 按 2.5.3 项下方法分别制备含洋川芎内酯 I 低、中、高 3 个质量浓度的尿液和胆汁样品 ( $n = 5$ ), 分别按 2.4.1 和 2.4.2 项下方法处理, 按 2.1 项下条件测定, 计算各样品峰面积和内标物峰面积的比值; 另取水 100  $\mu\text{L}$ , 按照上述操作配制相同质量浓度的洋川芎内酯 I 对照品溶液, 计算提取回收率。尿液中 3 个质量浓度下洋川芎内酯 I 的提取回收率分别为 (101.9 ± 1.21)%, (100.4 ± 3.07)%, (99.7 ± 1.89)%, 胆汁中 3 个质量浓度下洋川芎内酯 I 的提取回收率分别为 (93.4 ± 2.60)%, (94.0 ± 1.18)%, (93.9 ± 2.09)%。

**2.5.5 稳定性考察** 按 2.5.3 项下方法分别制备含洋川芎内酯 I 低、中、高 3 个质量浓度的尿液和胆汁样品 ( $n = 9$ ), 考察样品预处理后室温 (20  $^{\circ}\text{C}$ ) 放置 13, 56 h 和 -20  $^{\circ}\text{C}$  条件下反复冻融 3 次的稳定性, 分别按 2.4.1 和 2.4.2 项下方法处理, 按 2.1 项下条件测定, 结果见表 1, 表明各样品在上述条件下稳定性良好。

表 1 尿液和胆汁中洋川芎内酯 I 在不同条件下的稳定性 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 1 Stability of senkyunolide I in rat urine and bile under various storage conditions ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

生物样品	洋川芎内酯 I / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	稳定性 / %		
		室温放置 13 h	室温放置 56 h	反复冻融 3 次 / %
尿液	0.40	97.20 ± 8.81	101.10 ± 9.02	96.99 ± 9.09
	4.00	90.28 ± 2.10	89.97 ± 2.09	88.84 ± 0.55
	16.00	90.42 ± 1.23	90.37 ± 2.51	90.33 ± 0.69
胆汁	1.05	108.6 ± 1.29	100.90 ± 6.96	103.80 ± 1.38
	21.00	108.5 ± 2.77	102.80 ± 6.68	102.90 ± 5.45
	210.00	96.14 ± 1.36	92.12 ± 1.41	96.50 ± 2.36

**2.6 洋川芎内酯 I 在大鼠尿液和胆汁中的排泄** 测定各时间段尿液和胆汁中洋川芎内酯 I 的质量浓度, 与该时间段尿液或胆汁的体积相乘, 得该时间段中药物的排泄量, 计算药物累积排泄量和累积排泄率; 各时间段药物的排泄量与各时间段时间之比为排泄速率。大鼠灌胃或尾静脉注射给予

72 mg·kg<sup>-1</sup>洋川芎内酯 I 溶液后,按 2.1 项下条件进行定量分析,计算尿液和胆汁中该成分原形药的排泄参数,绘制累积排泄率-时间曲线和平均排泄速率-时间曲线,见图 3~6。结果表明灌胃和尾静脉给药 48 h 后累积经尿液排泄的原形药物量分别为 (179.8 ± 33.68), (264.8 ± 87.28) μg; 给药 36 h 后累积经胆汁排泄的原形药物量依次为 (359.4 ± 75.66), (426.3 ± 140.90) μg。大鼠经灌胃或尾静脉给药后,0~1 h 内胆汁中洋川芎内酯 I 的平均排泄速率最大,之后迅速降低,给药后 8 h 胆汁中原形药的排泄量达最大;尿液中原形药平均排泄速率在 3~9 h 内达最高,之后降低,服药后 24 h 尿液中原形药的排泄量最大。

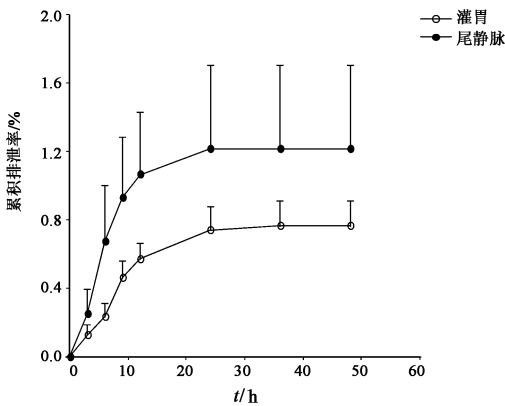


图 3 洋川芎内酯 I 在尿液中的累积排泄率-时间曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Fig. 3 Urinary accumulative excretion ratio-time curves of senkyunolide I after intravenous injection and intragastric administration to rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

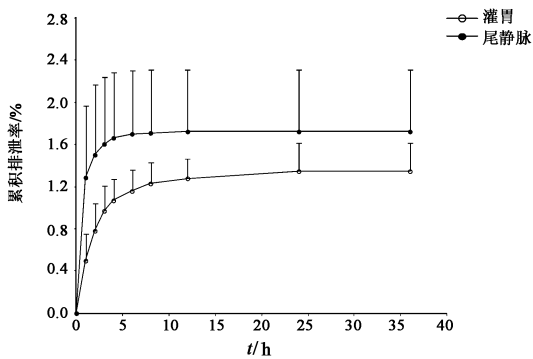


图 4 洋川芎内酯 I 在胆汁中的累积排泄率-时间曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Fig. 4 Biliary accumulative excretion ratio-time curves of senkyunolide I after intravenous injection and intragastric administration to rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3 讨论

药物代谢动力学研究包括吸收、分布、代谢和排泄,在洋川芎内酯 I 大鼠体内肠吸收动力学研究中发现,洋川芎内酯 I 在各个肠段均有较好的吸收,且

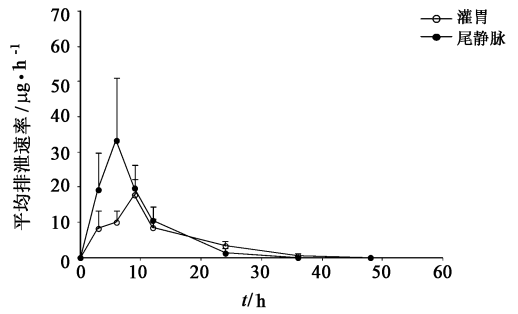


图 5 洋川芎内酯 I 在尿液中平均排泄速率-时间曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Fig. 5 Mean excretion rate-time curves of senkyunolide I in urine after intravenous injection and intragastric administration to rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

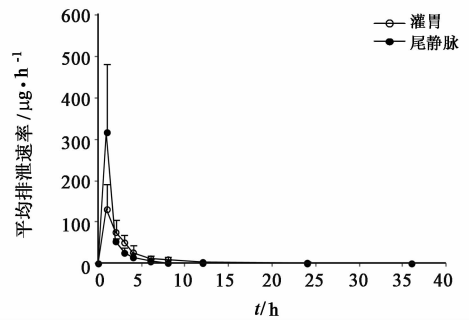


图 6 洋川芎内酯 I 在胆汁中排平均排泄速率-时间曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Fig. 6 Mean excretion rate-time curves of senkyunolide I in bile after intravenous injection and intragastric administration to rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

在十二指肠吸收最好<sup>[12-13]</sup>。同时在后续研究中发现,该成分在大鼠体内吸收迅速,广泛分布于体内各个组织,以肝、肾等分布较多,但在各个组织中滞留时间较短,无组织蓄积,在大鼠和小鼠的体内药动学研究中,其均表现出半衰期短、消除快、生物利用度不高<sup>[9-10]</sup>等特征。

本文研究结果显示大鼠灌胃或静脉给药后,洋川芎内酯 I 由尿和胆汁中排泄的量均很少,累积排泄率 < 4%。药物从体内排泄速度较快,尤其在胆汁中给药后 2 h 就达到总排泄量的 87%,这进一步证明了该药在体内消除较快。在前期对大鼠体内的代谢研究中,洋川芎内酯 I 表现出代谢途径广泛、代谢产物较多的特点,其中葡萄糖醛酸结合和谷胱甘肽结合可能为其主要的 2 种代谢途径<sup>[11]</sup>,推测体内代谢可能在洋川芎内酯 I 体内消除中起着一定作用。本文由于仅仅是对原形药在胆汁和尿液中的排泄进行研究,尚不能完全说明该成分在体内的变化过程,有必要对洋川芎内酯 I 体内主要代谢产物进行研

究,为其新药开发提供理论依据。

[参考文献]

- [1] Wang P S, Gao X L, Wang Y X, et al. Phthalides from the rhizome of *Ligusticum wallichii*[J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(9): 2033-2038.
- [2] Li H X, Ding M Y, Lv K, et al. Determination of the active ingredients in Chuanxiong by HPLC, HPLC-MS, and EI-MS[J]. *J Liq Chromatogr R T*, 2001, 24(13): 2017-2031.
- [3] 袁久荣,容蓉,王玉堂. 川芎饮片挥发油化学成分的研究[J]. *中国药学杂志*, 1999, 34(6): 406.
- [4] 洪鹰,季芳. 川芎中挥发性化学成分的研究[J]. *中国药业*, 2003, 12(6): 31-32.
- [5] Beck J J, Chou S C. The Structural diversity of phthalides from the Apiaceae[J]. *J Nat Prod*, 2007, 70(5): 891-900.
- [6] Yan R, Li S L, Chung H S, et al. Simultaneous quantification of 12 bioactive components of *Ligusticum chuanxiong* Hort. by high-performance liquid chromatography[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 37(1): 87-95.
- [7] 曹建敏,王宗花,丁明玉,等. 反相高效液相色谱法同时测定川芎中的四种内酯类化合物[J]. *色谱*, 2005, 23(5): 531-533.
- [8] 袁莹,林晓,冯怡,等. 川芎治疗偏头痛效应组分的体内移行研究[J]. *中国药学杂志*, 2010, 45(9): 694-697.
- [9] 熊耀坤,林晓,梁爽,等. HPLC法测定小鼠血浆中洋川芎内酯I的浓度及药动学研究[J]. *药物分析杂志*, 2013, 33(3): 371-375.
- [10] He C Y, Wang S, Feng Y, et al. Pharmacokinetics, tissue distribution and metabolism of senkyunolide I, a major bioactive component in *Ligusticum chuanxiong* Hort. (Umbelliferae)[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 142(3): 706-713.
- [11] Xiong Y K, Lin X, Liang S, et al. Identification of senkyunolide I metabolites in rats using ultra performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 81/82: 178-186.
- [12] 于泽,魏海,熊耀坤,等. 洋川芎内酯I大鼠在体肠吸收动力学研究[J]. *中国药学杂志*, 2013, 48(8): 628-632.
- [13] 王强,沈岚,马诗瑜,等. 不同剂量川芎对天麻有效成分在大鼠体内的药动学影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(2): 103-109.

[责任编辑 刘德文]