

# 八味沉香散的药物代谢动力学分析

高文军<sup>1</sup>, 于牡丹<sup>1</sup>, 肖云峰<sup>1,2</sup>, 王玉华<sup>1,2\*</sup>

(1. 内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

**[摘要]** **目的:**研究大鼠灌胃八味沉香散后的药物代谢动力学行为,为该制剂的临床合理用药提供参考。**方法:**采用HPLC测定大鼠血浆中丁香酚的血药浓度,以3,4-二甲氧基苯乙烯为内标,流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~5 min,37%~40% A;5~10 min,40%~45% A;10~14 min,45% A;14~23 min,90% A;23~35 min,37% A),检测波长280 nm。将八味沉香散灌胃给药后,利用DAS 2.0软件对大鼠体内丁香酚的平均血药浓度-时间数据进行隔室模型拟合。**结果:**大鼠经灌胃给药后,以二室模型计算血药浓度与实测值契合较好,优于其他模型。分布半衰期20.031 min,消除半衰期69.315 min。**结论:**检测血浆中丁香酚含量的方法简便、准确、稳定,适用于八味沉香散中丁香酚的药物代谢动力学分析;丁香酚在大鼠体内分布较快,在大鼠体内主要以消除过程为主,代谢速度中等。

**[关键词]** 丁香酚; 八味沉香散; 药代动力学; 3,4-二甲氧基苯乙烯; 半衰期

**[中图分类号]** R969.1;R284.1;R945;R944.2+4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)20-0082-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016200082

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160829.1649.004.html>

**[网络出版时间]** 2016-08-29 16:49

## Pharmacokinetic Analysis of Bawei Chenxiang San

GAO Wen-jun<sup>1</sup>, YU Mu-dan<sup>1</sup>, XIAO Yun-feng<sup>1,2</sup>, WANG Yu-hua<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China;

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

**[ Abstract ]** **Objective:** To estimate the pharmacokinetics of eugenol in rats after intragastric administration of Bawei Chenxiang San. **Method:** HPLC was employed to determine the plasma concentration of eugenol with 3, 4-dimethoxystyrene as the internal standard, mobile phase of acetonitrile-water for gradient elution and detection wavelength at 280 nm. After intragastric administration of Bawei Chenxiang San, DAS 2.0 software conducted compartment model fitting of average plasma concentration-time data of eugenol. **Result:** After intragastric administration of Bawei Chenxiang San, two-compartment model (weight of 1/cc) calculated the plasma concentration of eugenol was completely consistent with the measured value, and was superior to other models. The distribution half-life ( $t_{1/2\alpha}$ ) was 20.031 min and the elimination half-life ( $t_{1/2\beta}$ ) was 69.315 min. **Conclusion:** The established HPLC method is convenient, accurate and stable, which can be used for pharmacokinetics of eugenol in Bawei Chenxiang San. Eugenol distributes rapidly in rats, the main process of eugenol in rats is elimination with moderate metabolic rate.

**[ Key words ]** eugenol; Bawei Chenxiang San; pharmacokinetics; 3, 4-dimethoxystyrene; half-life

**[收稿日期]** 20151106(011)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81360678);内蒙古自治区科技计划项目(1405125);内蒙古自治区科技创新引导奖励资金项目(20121502)

**[第一作者]** 高文军, 硕士, 从事中蒙药材、方剂药效物质基础与其质量控制研究, E-mail: qxygwj@163.com

**[通讯作者]** \*王玉华, 博士, 教授, 从事中蒙药材、方剂药效物质基础与其质量控制研究, Tel: 0471-6653151; E-mail: yuhuawang59@163.com

八味沉香散由丁香、肉豆蔻、沉香、广枣、木香、旋复花、阿魏、动物心脏组成,收载于民间验方《普济方集》中。该方具有镇“赫依”、止痛、温胃、祛“巴达干”、燥“协日乌素”的作用,用于“心赫依”病、心悸、气短、胸闷、心区疼痛,临床应用广泛,疗效确切。目前,关于八味沉香散的药代动力学研究尚未见报道。丁香在该方中属于主要药味,丁香酚是丁香药材的主要成分之一,具有镇痛、抗炎等作用<sup>[1-2]</sup>。最新药效学研究表明丁香酚在调节心血管系统方面有一定的作用,但过量服用则具有一定的毒副作用<sup>[3]</sup>。另有研究表明丁香酚的刺激性会引起呼吸综合征,误食会导致代谢性酸中毒,对婴幼儿会引起低血糖症和肝功能衰竭等副作用<sup>[4]</sup>。本实验采用HPLC测定八味沉香散中丁香酚在大鼠体内的药代动力学特征,为该制剂的临床合理用药提供参考。

## 1 材料

LC-20A型高相液相色谱仪(日本岛津公司),DL-5000型冷冻离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司),DHG-9240A型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司),TTL-DC II型氮吹仪(北京同泰联科技发展有限公司),PB-21 AG型pH计(北京赛多利斯仪器系统有限公司),JA5003N型1/1千电子分析天平(上海菁海仪器有限公司),AB135-S型1/10万电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司)。

八味沉香散(自制,批号20150109),丁香酚对照品(中国食品药品检定研究院,批号110725-201213,纯度 $\geq 99.7\%$ ),3,4-二甲氧基苯乙烯(北京振翔科技有限公司,批号10-UPA-68-2,纯度 $\geq 97\%$ ), $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶(美国Sigma公司,批号G0876),乙腈、甲醇、正己烷均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

清洁级Wistar大鼠,雌雄各半,体重(300 $\pm$ 30)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2012-0001。

## 2 方法

**2.1 样品血浆制备** 健康Wistar大鼠6只,均在实验前12h禁食不禁水,按0.54 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>灌胃给予八味沉香散,分别于给药后5,10,15,20,30,45,60,90,120,180,240,360,720 min经眼眶采血,每个时间点约采集0.5 mL,置于肝素抗凝的离心管中,以5 500 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>离心5 min,取上清液于1 mL离心管中,-20 $^{\circ}$ C冰箱中保存待测。

**2.2 溶液配制** 取丁香酚对照品适量,置于100

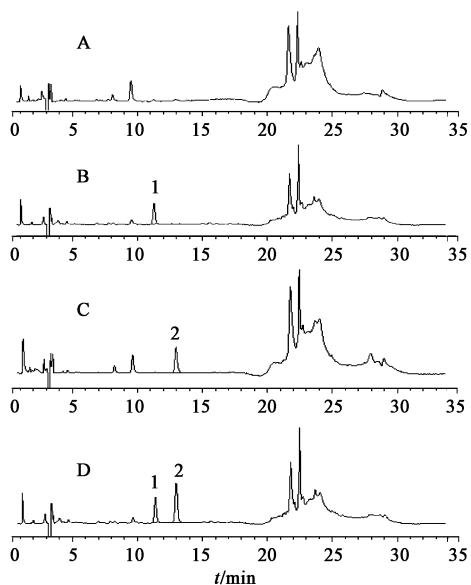
mL量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,得113.7 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>对照品储备液。精密称取3,4-二甲氧基苯乙烯对照品适量,置于100 mL量瓶中,加入溶解并定容至刻度,得104.8 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>内标储备液,使用时稀释至10.48 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>。给大鼠灌胃羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液后,眼眦静脉丛取血,置于加有肝素的塑料试管中,于5 500 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>离心5 min,取上清液,置于1 mL离心管中,得空白血浆,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

**2.3 血浆样品处理**<sup>[5-6]</sup> 精密吸取血浆100  $\mu$ L于15 mL尖底离心管中,加入0.1 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>乙酸钠缓冲液(pH 4.0,下同)100  $\mu$ L,振摇,加入 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶10  $\mu$ L,振摇,加盖,37 $^{\circ}$ C温育1 h,取出,放至室温,精密加入内标溶液和甲醇各100  $\mu$ L,振摇,加入正己烷3 mL,涡旋振荡1 min,于4 500 r $\cdot$ min<sup>-1</sup>离心3 min。取正己烷层,重复2次,合并正己烷层,45 $^{\circ}$ C水浴下氮气吹至近干,精密加入甲醇200  $\mu$ L复溶,得供试品溶液。

**2.4 色谱条件** Alltima HP C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm,5  $\mu$ m),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~5 min,37%~40% A;5~10 min,40%~45% A;10~14 min,45% A;14~23 min,90% A;23~35 min,37% A),检测波长280 nm,柱温35 $^{\circ}$ C,流速1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>,进样量5  $\mu$ L。

**2.5 专属性试验** 取空白血浆,按2.3项下方法处理,其中内标溶液100  $\mu$ L用等体积甲醇代替,其余同法操作,得空白血浆HPLC;取空白血浆,按2.3项下方法处理,其中内标溶液100  $\mu$ L用等体积丁香酚对照品溶液替代,其余同法操作,得空白血浆+丁香酚对照品HPLC;取空白血浆,按2.3项下方法处理,得空白血浆+内标HPLC;取大鼠灌胃给药后的血浆样品,按2.3项下方法处理,得大鼠血浆样品+内标HPLC。见图1。结果表明血浆中内源性物质不干扰丁香酚对照品和内标物质的测定,表明该方法专属性较高。

**2.6 标准曲线绘制** 精密吸取大鼠空白血浆100  $\mu$ L,共6份,分别置于15 mL尖底离心管中,加入0.1 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>乙酸钠缓冲液100  $\mu$ L,振摇,加入 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶10  $\mu$ L,振摇,加盖,37 $^{\circ}$ C温育1 h,取出,放至室温,分别精密加入系列丁香酚对照品溶液和内标溶液各100  $\mu$ L,其余按2.3项下方法处理,使对照品在生物样品中质量浓度分别为1.137,3.411,5.685,11.370,17.055,22.740 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>,精密吸取5  $\mu$ L进样,以对照品和内标的峰面积比值为纵坐标,对照品与内标的质量浓度比值为横坐标,采用



A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 对照品; C. 空白血浆 + 内标; D. 供试品 + 内标; 1. 丁香酚; 2. 3,4-二甲氧基苯乙烯

图 1 大鼠灌胃八味沉香散后血浆 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of rat plasma after intragastric administration of Bawei Chenxiang San

加权最小二乘法进行回归运算, 得丁香酚回归方程  $Y = 0.0434X + 0.0071$  ( $r = 0.9996$ ), 线性范围  $1.137 \sim 22.740 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 在大鼠血浆中最低检测限  $0.162 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.7 精密度及准确度试验** 精密吸取空白血浆  $100 \mu\text{L}$ , 酶解后精密加入不同质量浓度的丁香酚对照品溶液适量, 分别配成低、中、高 3 种质量浓度 ( $3.411, 11.370, 17.055 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的质控 (QC) 样品

( $n = 6$ ), 按 2.3 项下方法处理, 连续测定 3 d, 计算日内精密 RSD 分别为 2.1%, 0.9%, 0.5%, 日间精密 RSD 分别为 5.9%, 0.8%, 1.4%。准确度在真实值的  $\pm 20\%$  之间, 符合有关生物样品的分析要求<sup>[7]</sup>。

**2.8 提取回收率试验**<sup>[8-9]</sup> 精密吸取大鼠空白血浆  $100 \mu\text{L}$  于离心管中, 加入  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸钠缓冲液  $100 \mu\text{L}$ , 振摇, 加入  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶  $10 \mu\text{L}$ , 振摇, 加盖,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  温育 1 h, 取出, 放至室温, 分别精密加入丁香酚对照品溶液, 按 2.3 项下方法处理, 使对照品在生物样品中质量浓度分别为  $3.411, 11.370, 17.055 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $n = 6$ ), 进样测定; 另取相应质量浓度的丁香酚对照品溶液进样, 计算丁香酚的提取回收率分别为 93.49%, 99.57%, 94.68%。

**2.9 稳定性试验** 取大鼠给药 5, 20, 45 min 的血样作为低、高、中质量浓度的稳定性样品, 取完血样后, 立即按 2.3 项下方法处理, 作为正常值。血样在室温  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  放置 7 h 后按 2.3 项下方法处理, 考察样品在室温条件下的稳定性。血样在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中放置 24 h, 按 2.3 项下方法处理, 考察样品在冷藏条件下的稳定性。血样在  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中放置 24 h, 取出, 室温自然融解, 完全融化后再置于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中, 此过程重复 3 次, 取出放置室温, 按 2.3 项下方法处理, 考察样品在冻融条件下的稳定性。见表 1。结果表明给药血浆样品的室温、冷藏、冻融稳定性的测定结果变化均在允许范围内 (RSD 均  $< 15\%$ )。

表 1 大鼠灌胃八味沉香散后血浆样品的稳定性试验

Table 1 Stability test of rat plasma after intragastric administration of Bawei Chenxiang San

取血点/min	正常值		室温 7 h		冷藏 24 h		冷冻 3 d	
	质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD $/\%$	质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD $/\%$	质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD $/\%$	质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD $/\%$
5	$4.278 \pm 0.619$	14.5	$4.325 \pm 0.628$	14.5	$4.301 \pm 0.636$	14.8	$4.359 \pm 0.653$	15.0
20	$8.764 \pm 0.295$	3.4	$8.806 \pm 0.318$	3.6	$8.583 \pm 0.474$	5.5	$8.552 \pm 0.444$	5.2
45	$17.023 \pm 0.467$	2.7	$17.197 \pm 0.507$	3.0	$16.979 \pm 0.493$	2.9	$16.659 \pm 0.668$	4.0

**2.10 药代动力学参数分析**<sup>[10-12]</sup> 精密吸取样品血浆  $100 \mu\text{L}$ , 按 2.3 项下方法处理, 按 2.4 项下色谱条件测定, 数据采用 DAS 2.0 软件处理, 计算药代动力学参数和房室模型, 绘制平均血药浓度-时间曲线, 见图 2。结果表明血药浓度与时间呈双指数函数曲线关系。对大鼠体内丁香酚的血药浓度-时间数据进行隔室模型拟合, 分别用一室、二室、三室模型及各种权重进行曲线拟合, 发现按非静脉注射二

室模型 (权重  $1/\text{cc}$ ) 计算的药浓度值和实测值契合较好, 优于其他模型, 见表 2。结果发现大鼠灌胃给药后, 药代动力学过程符合二室模型。分布半衰期 ( $t_{1/2\alpha}$ )  $20.031 \text{ min}$ , 说明丁香酚在大鼠体内分布较快。消除半衰期 ( $t_{1/2\beta}$ )  $69.315 \text{ min} > t_{1/2\alpha}$ , 说明丁香酚在大鼠体内主要以消除过程为主, 代谢速度中等。从中央室向外周室转运的室间转运常数 ( $K_{12}$ )  $0.024 \text{ min}^{-1}$ , 从外周室向中央室转运的室间转运常数

( $K_{21}$ ) $0.016 \text{ min}^{-1}$ ,说明丁香酚从中央室向外周室的转运速率大于从外周室向中央室的转运速率。

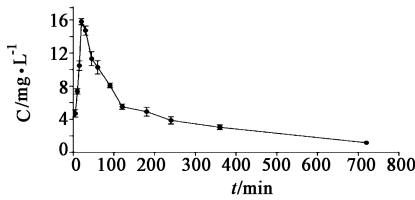


图 2 大鼠灌胃八味沉香散后丁香酚的平均血药浓度-时间曲线  
Fig. 2 Average plasma concentration-time curve of eugenol after intragastric administration of Bawei Chenxiang San

表 2 八味沉香散中丁香酚在大鼠体内的药代动力学参数

Table 2 Pharmacokinetic parameters of eugenol in rats

房室参数	单位	数值
$t_{1/2\alpha}$	min	20.031
$t_{1/2\beta}$	min	69.315
$V_1$	$\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$	21.911
CL	$\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	0.165
$\text{AUC}_{0-t}$	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$	2780.282
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$	3301.164
$K_{10}$	$\text{min}^{-1}$	0.008
$K_{12}$	$\text{min}^{-1}$	0.024
$K_{21}$	$\text{min}^{-1}$	0.016

### 3 讨论

本文对血浆样品的提取溶剂进行了考察,选择乙醚、乙酸乙酯和正己烷进行比较。结果发现乙醚难以从血浆样品中提取到丁香酚,而乙酸乙酯和正己烷提取效果接近,但是在色谱图中正己烷比乙酸乙酯有更多信息可体现。血浆取样量与正己烷加入量的比例对实验结果有较大的影响。当血浆取样量为 250  $\mu\text{L}$  时,加入正己烷 3 mL,涡旋之后两者乳化程度开始变得较为严重,以至于离心之后难以分层。如果通过增加正己烷的萃取次数来消除乳化对测定结果带来的影响,这样又会增加整个操作过程的氮吹时间,导致分析时间延长,对分析过程带来不利影响。经过多次预试验发现,当血浆取样量改为 100  $\mu\text{L}$  (正己烷加入量 3 mL) 时,乳化现象很少发生,而且此时血浆中丁香酚含量相对较大,故确定血浆

取样量 100  $\mu\text{L}$ 。另外,氮吹时间是影响本实验分析成败的关键因素。由于丁香酚是易挥发性物质,因此氮吹时间的控制对回收率影响至关重要。氮吹时间过长,溶剂蒸干过于严重,会导致丁香酚损失较大,回收率变低。

#### [参考文献]

[1] 刘阳,文涛,冯甲棣. 丁香酚对致热家兔弓状核区脑组织中 PGE-2 和 cAMP 含量的影响[J]. 中国医科大学学报,2001,30(5):339-341.

[2] 阳卫超,欧阳五庆,何欣,等. 复方丁香酚纳米乳的制备及抗炎镇痛药效研究[J]. 中国医药工业杂志,2008,39(5):352-355.

[3] 袁德俊. 丁香酚对体外培养心肌细胞缺氧/复氧损伤的影响[D]. 广州:广州中医药大学,2009.

[4] 孔晓军,刘希望,李剑勇,等. 丁香酚的药理学作用研究进展[J]. 湖北农业科学,2013,52(3):508-511.

[5] Fischer I U, Dengler H J. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for the determination of eugenol in body fluids[J]. J Chromatogr,1990,525(2):369-377.

[6] Fischer I U, von Unruh G E, Dengler H J. The metabolism of eugenol in man[J]. Xenobiotica,1990,20(2):209-222.

[7] 张剑萍,郭澄. 生物样品分析中的方法学验证[J]. 中国药房,2008,19(31):2469-2471.

[8] 唐进法,宋云香,鲁静,等. 丹红注射液中丹参素和原儿茶醛在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(6):118-121.

[9] 韩刚,王彦雪,康欣,等.  $18\beta$ -甘草酸对大黄酸在大鼠体内药物动力学的影响[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(3):273-275.

[10] 黄巍,熊伟,唐灿,等. 血府逐瘀汤中芍药苷在大鼠体内的药代动力学特性[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(15):84-87.

[11] 张玮,刘守信. 非诺贝特胶囊在健康人体内的药物代谢动力学研究[J]. 中国现代医学杂志,2014,24(31):56-59.

[12] 韩静文,黄成,宋珏,等. 栀子柏皮汤不同配伍在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(8):110-113.

[责任编辑 刘德文]