

苍艾挥发油经鼻吸收的药代动力学及组织分布

黄秋艳, 熊磊, 孔淑君, 汪红梅, 王辉, 马云淑*, 陈柏君
(云南中医学院, 昆明 650500)

[摘要] **目的:**研究苍艾挥发油经家兔鼻腔给药的药代动力学及经大鼠鼻腔吸收的组织分布,为后期开发制备成临床用药奠定基础。**方法:**家兔经鼻腔给予苍艾挥发油后,经UPLC检测血浆中苍艾挥发油主成分丁香酚的浓度,流动相甲醇-1%冰乙酸(45:55),流速 $0.4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长280 nm,进样量 $1\ \mu\text{L}$ 。试验数据采用DAS 3.0软件(非房室模型)进行拟合并计算药代动力学参数。采用HPLC测定大鼠脑组织、心、肝、脾、肺、肾中丁香酚的含量,流动相甲醇-1%冰乙酸(65:35),检测波长280 nm。**结果:**苍艾挥发油在血液中主要的药代动力学参数为达峰时间(T_{\max})(0.083 ± 0) h,药峰浓度(C_{\max})(1.150 ± 0.141) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,药-时曲线下面积($\text{AUC}_{0-\infty}$)(0.376 ± 0.085) $\text{h}\cdot\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,平均滞留时间($\text{MRT}_{0-\infty}$)(0.505 ± 0.039) h。苍艾挥发油经大鼠鼻吸收后,快速分布至各组织中,其中肺组织中含量最高,其次为心脏及脑组织,肝、脾、肾组织中的分布量较少。**结论:**家兔药代动力学及大鼠组织分布试验结果均表明苍艾挥发油经鼻吸收后体内滞留时间较短,具有靶向趋势。

[关键词] 苍艾挥发油; 鼻腔给药; 药物代谢; 组织分布; 丁香酚; 丹皮酚

[中图分类号] R969.1;R284.1;R945;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)23-0094-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016230094

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160920.0911.010.html>

[网络出版时间] 2016-09-20 9:11

Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Cang'ai Volatile Oil by Nasal Absorption

HUANG Qiu-yan, XIONG Lei, KONG Shu-jun, WANG Hong-mei, WANG Hui, MA Yun-shu*, CHEN Bo-jun
(Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

[Abstract] **Objective:** To study on pharmacokinetics in rabbits and tissue distribution in rats of Cang'ai volatile oil after nasal absorption. **Method:** After intranasal administration of Cang'ai volatile oil, the content of eugenol in rabbit plasma was detected by UPLC, mobile phase was methanol-1% glacial acetic acid (45:55), flow rate was $0.4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, the detection wavelength was 280 nm and sample volume was $1\ \mu\text{L}$. The data were fitted by DAS 3.0 software (non-compartment model) and pharmacokinetic parameters were calculated. The contents of eugenol in rats' brain, heart, liver, spleen, lung and kidney were determined by HPLC after intranasal administration of Cang'ai volatile oil. **Result:** Primary pharmacokinetic parameters of Cang'ai volatile oil were as follows: T_{\max} of (0.083 ± 0) h, C_{\max} of (1.150 ± 0.141) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ of (0.376 ± 0.085) $\text{h}\cdot\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{MRT}_{0-\infty}$ of (0.505 ± 0.039) h. Cang'ai volatile oil was rapidly distributed into all tissues after intranasal absorption, the content of eugenol in the lung was the highest, followed by the heart and brain, its distribution in liver, spleen and kidney was small. **Conclusion:** *In vivo* retention time of Cang'ai volatile oil is short with brain targeting trend.

[Key words] Cang'ai volatile oil; nasal administration; pharmacokinetics; tissue distribution; eugenol; paeonol

苍艾挥发油是以云南中医学院熊磊教授预防上呼吸道感染临床效验方为基础,由苍术、艾叶、丁香、藿香、豆蔻、花椒及佩兰7味中药组方^[1],后期拟开发为新药。方中苍术、艾叶为君药,芳香化湿、避

[收稿日期] 20151226(009)

[基金项目] 国家自然科学基金地区基金项目(81160534,81560740)

[第一作者] 黄秋艳,在读硕士,从事新型给药系统的研究,Tel:15912165160,E-mail:357668065@qq.com

[通讯作者] *马云淑,博士,教授,从事药物新剂型研究,Tel:13577043108,E-mail:yunshuma2@126.com

秽解毒;藿香为臣药,芳香化湿、解表祛暑,诸药合用,共奏芳香化浊、避秽解毒之功。熊磊等^[2]对苍艾挥发油进行了 GC-MS 分析,共检测出 37 种化学成分,鉴定了其中 13 种主要化学成分,并对各单味药的主要成分及其功能进行了归纳,其中丁香酚含量较高;急性毒性及刺激性试验^[3]确定小鼠灌胃苍艾挥发油后的半数致死量 $3.47 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,约相当于临床儿童使用剂量的 2 479 倍,并发现苍艾挥发油对呼吸道无明显刺激性作用;体外抑菌作用研究表明苍艾挥发油对金黄色葡萄球菌、乙型链球菌、白色念珠球菌均有体外抑菌作用,并在一定剂量范围内呈量效关系^[4];采用空气消毒试验及空间灭菌试验,选择儿科住院部普通病房、治疗室、门诊诊室及特制金属柜,观察苍艾挥发油的空气消毒作用,结果发现苍艾挥发油空气消毒效果优于醋熏、紫外线消毒^[5];此外,功能核磁共振技术检测发现,苍艾挥发油通过鼻腔给药后,具有脑靶向性。

临床研究表明上呼吸道感染^[6]主要由细菌和病毒引起,是儿科常见病,发病人数占儿科门诊患者的半数以上。鼻腔给药具有可避免药物胃肠道刺激和降解、可避免肝脏首过效应、实现脑靶向等优势,已成为制剂学领域的研究热点之一^[7]。本实验旨在治疗小儿上呼吸道感染类疾病的基础上,研究苍艾挥发油通过家兔经鼻吸收后的体内药代动力学和组织分布,为后期将该方开发为临床新药奠定基础。

1 材料

Nexera LC-30A 型超高效液相色谱仪(日本岛津公司),1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),XK96-A 型快速混匀器(姜堰市新康医疗器械有限公司),YQD-6 型氮气减压器(上海减压器厂有限公司),BT25S 型分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],TGL-16G 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂),XHF-I 型高速分散器(内切式组织匀浆机,宁波新芝生物科技股份有限公司)。

苍术、艾叶等 7 味药材均购自云南中医学院附属医院门诊部,经云南中医学院赵荣华教授鉴定,均符合《中国药典》2015 年版相关项下要求;丁香酚、丹皮酚对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110725-201213,110708-201407),水为超纯水,甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

普通级雄性新西兰大白兔 6 只,购自成都达硕生物科技有限公司,合格证号 SCXK(川)2008-0024,体重 $(2.5 \pm 0.5) \text{ kg}$;普通级 SD 大鼠 18 只,雌雄各半,体重 $(200 \pm 20) \text{ g}$,由湖南斯莱克景达试验

动物有限公司提供,合格证号 SCXK(湘)2011-0003。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 75 mm, 2.7 μm),流动相甲醇-1% 冰乙酸(45:55),流速 $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 280 nm,柱温 30 ℃,进样量 1 μL。

2.2 对照品溶液及内标液的制备 精密称取丁香酚对照品 12.3 mg 于 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇定容至刻度,得 $1.23 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 丁香酚贮备液,进一步稀释为 9.84×10^{-5} , 1.968×10^{-4} , 4.92×10^{-4} , 1.476×10^{-3} , 2.46×10^{-3} , 4.92×10^{-3} , $49.2 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液,冰箱保存备用。精密称取丹皮酚 12.1 mg 于 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,进一步稀释得 $2.42 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 丹皮酚内标液,冰箱保存备用。

2.3 血浆样品的处理^[8] 精密量取血浆样品 600 μL 于离心管中,加入内标液 100 μL,正己烷和乙酸乙酯各 3 mL,漩涡振荡 3 min,于 $1\ 100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液氮气下吹干,加甲醇 150 μL 复溶,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,进样分析。

2.4 方法学考察

2.4.1 标准曲线的制备 取 10 mL 离心管 7 支,精密加入家兔空白血浆 600 μL,分别加入 2.2 项下不同质量浓度的丁香酚对照品溶液 100 μL,得系列丁香酚血浆溶液,于各管中加入内标液 100 μL,按 2.3 项下方法处理,按 2.1 项下色谱条件测定,以丁香酚质量浓度为横坐标,丁香酚与内标的峰面积比值为纵坐标,得回归方程 $Y = 0.491\ 9X + 0.206\ 6$ ($R^2 = 0.999\ 6$),线性范围 $1.4 \times 10^{-5} \sim 7.02 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,最低定量限 $1.4 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4.2 精密度试验 精密量取血浆样品 600 μL,配制高 ($7.02 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),中 ($7.00 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),低 ($7.00 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 质量浓度的丁香酚血浆溶液各 3 份,按 2.1 项下条件于 1 d 内测定,计算日内精密度 RSD 分别为 2.6%, 2.3%, 1.0%,连续测定 3 d,计算日间精密度 RSD 分别为 0.5%, 1.4%, 2.6%。

2.4.3 回收率试验 取 2.4.2 项下高、中、低质量浓度的丁香酚血浆溶液,按 2.1 项下条件测定,计算方法回收率分别为 98.75%, 99.31%, 93.12%, RSD 依次为 3.0%, 3.6%, 7.2%。另取上述 3 种质量浓度丁香酚血浆溶液各 3 份,按 2.3 项下方法处理,按 2.1 项下条件测定,计算萃取回收率分别为

86.31%, 95.86%, 92.56%, RSD 依次为 2.9%, 2.3%, 9.6%。

2.4.4 稳定性试验 取 2.4.2 项下高、中、低质量浓度的丁香酚血浆溶液各 3 份,分别考察其于室温放置 12 h,4 °C 放置 3 d 及 -20 °C 存放 2 周的稳定性,按 2.1 项下色谱条件测定,结果 RSD 均 < 9.8%。

2.5 家兔经鼻给予苍艾挥发油的药动学研究^[9-10]

取雄性家兔 6 只,给药前禁食 12 h,不禁水。按剂量 50 mg·kg⁻¹ 鼻腔给予苍艾挥发油(滴鼻前用适量聚山梨酯-80 增溶),分别于不同时间点(0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 h)耳缘静脉取血 1.5 mL,收集于含有肝素钠离心管中,于 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,分离上层血浆,按 2.3 项下方法处理,按 2.1 项下条件测定,绘制药-时曲线,见图 1。将药-时曲线数据输入 DAS 3.0 软件,得主要药动学参数,药-时曲线下面积(AUC_{0-t}, AUC_{0-∞}),平均滞留时间(MRT_{0-t}, MRT_{0-∞}),半衰期(t_{1/2}),达峰时间(T_{max}),清除率(CL),表观分布容积(V_z),药峰浓度(C_{max})分别为(0.375 ± 0.085) h·mg·L⁻¹, (0.376 ± 0.085) h·mg·L⁻¹, (0.499 ± 0.038) h, (0.505 ± 0.039) h, (0.592 ± 0.164) h, (0.083 ± 0) h, (139.553 ± 37.264) L·h⁻¹·kg⁻¹, (117.590 ± 34.625) L·kg⁻¹, (1.150 ± 0.141) mg·L⁻¹。表明家兔经鼻给予苍艾挥发油后,吸收迅速、滞留时间短。

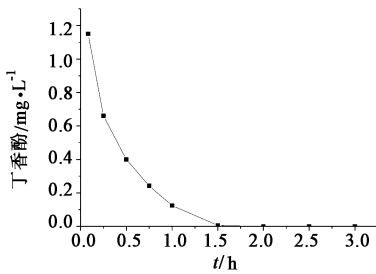
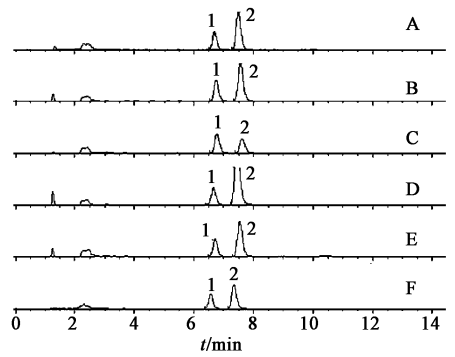


图 1 家兔鼻腔给予苍艾挥发油后的药-时曲线(n=6)
Fig.1 Mean plasma concentration-time curves of Cang'ai volatile oil after intranasal administration(n=6)

2.6 组织分布试验

2.6.1 色谱条件 Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-1% 冰乙酸(65:35),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 280 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL。见图 2~3。结果表明丁香酚与内标的分离度良好,且内源性物质不干扰样品出峰。

2.6.2 对照品及内标液的制备 精密称取丁香酚对照品 42.6 mg 于 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇定容至刻度,得贮备液;精密吸取该贮备液适量,加甲醇



A. 心脏;B. 肝脏;C. 脾脏;D. 肺脏;E. 肾脏;F. 脑;1. 丹皮酚(内标);
2. 丁香酚(图 4 同)

图 2 含对照品和内标的大鼠组织溶液 HPLC

Fig. 2 HPLC chromatograms of rat tissue solutions containing eugenol and paeonol

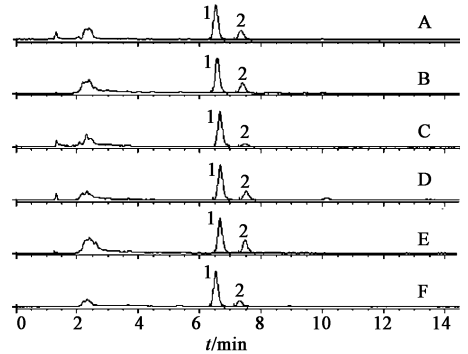


图 3 鼻腔给药 15 min 后的大鼠组织 HPLC
Fig. 3 HPLC chromatograms of rat tissues after nasal administration of Cang'ai volatile oil for 15 min

稀释成系列对照品溶液,置于冰箱中保存。另精密称取丹皮酚 20 mg 至 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,稀释得 0.2 g·L⁻¹ 内标液,备用。

2.6.3 组织样品的处理^[11] 精密量取组织匀浆液 1 mL 于离心管中,加入内标液 10 μL,加入正己烷和乙酸乙酯各 2 mL,漩涡振荡 3 min,于 1 100 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液于另一离心管中,按上述方法反复操作 3 次,合并上清液于氮气下吹干,加甲醇 150 μL 复溶后经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,进样。

2.6.4 标准曲线的制备 精密量取 2.6.2 项下系列丁香酚对照品溶液及内标液各 10 μL,加入到各空白组织匀浆液中,按 2.6.3 项下方法处理,按 2.6.1 项下色谱条件测定,以丁香酚质量浓度为横坐标,丁香酚与内标的峰面积比值为纵坐标,得各组织匀浆液中丁香酚的标准曲线,见表 1。

2.6.5 精密度试验 精密量取空白组织匀浆液 1 mL,取 2.6.2 项下丁香酚对照品溶液,按 2.6.3 项下方法配制高、中、低质量浓度的丁香酚组织匀浆

表 1 各组织匀浆液中丁香酚的标准曲线和线性范围

Table 1 Standard curves and linear ranges of eugenol in tissue homogenate

组织	回归方程	r	线性范围/mg·L ⁻¹
脑	Y = 0.150 1X - 0.080 6	0.998 4	0.99 ~ 39.7
心	Y = 0.121 7X - 0.088 5	0.999 3	0.99 ~ 39.7
肝	Y = 0.099 9X - 0.006 3	0.999 8	0.99 ~ 79.4
脾	Y = 0.091 9X - 0.023 4	0.997 9	0.99 ~ 39.7
肺	Y = 0.094 7X - 0.172 0	0.999 2	0.99 ~ 19.9
肾	Y = 0.144 0X - 0.150 1	0.999 5	0.99 ~ 79.4

液各 3 份,按 2.6.1 项下色谱条件分析,于 1 d 内测定 6 次,计算日内精密度;连续测定 3 d,计算日间精密度。结果 RSD 均 <12.0%,表明仪器精密度良好。

2.6.6 回收率试验 取 2.6.5 项下高、中、低质量浓度的丁香酚组织匀浆液各 3 份,按 2.6.1 项下色谱条件测定,计算各组织中的方法回收率 78.62% ~ 100.30%,RSD 1.3% ~ 11.7%。另取上述 3 种质量浓度丁香酚血浆溶液各 3 份,按 2.6.3 项下方法处理,按 2.6.1 项下色谱条件测定,计算各组织中的萃取回收率 80.76% ~ 98.84%,RSD 0.6% ~ 9.5%。

2.6.7 体内组织分布研究^[12] 取 SD 大鼠 18 只,随机等分为 3 组,实验前禁食 12 h,不禁水。按剂量 82.35 mg·kg⁻¹ 鼻腔给予苍艾挥发油,分别于给药后 5,15,30 min 处死,取出大鼠脑组织、心、肝、脾、肺及肾脏,剔除筋膜,用生理盐水清洗干净,滤纸吸干,称定质量,生理盐水与组织按 1:3 的比例进行匀浆。按 2.6.3 项下方法处理,按 2.6.1 项下条件测定,见表 2。结果表明苍艾挥发油经大鼠鼻腔给药后,快速吸收入肺部,含量最高,此外,心脏及脑组织的含量也较高。脾脏中含药量不高,且变化不明显。肝、肾组织中含药量随给药时间的延长而增加。

表 2 给予苍艾挥发油后不同时间点各组织中丁香酚的质量分数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Concentrations of eugenol in tissues after administration of Cang'ai volatile oil at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 6$) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

组织	5 min	15 min	30 min
脑	26.78 ± 9.62	10.68 ± 1.57	5.00 ± 1.32
心	45.39 ± 14.77	17.27 ± 3.09	8.74 ± 2.31
肝	11.75 ± 1.66	23.13 ± 5.38	46.41 ± 13.12
脾	9.90 ± 3.33	10.11 ± 2.91	4.02 ± 1.51
肺	185.82 ± 66.47	29.01 ± 13.23	3.97 ± 2.06
肾	11.39 ± 2.55	18.86 ± 1.97	36.16 ± 6.14

3 讨论

苍艾挥发油对肺气虚症的疗效在前期实验中已得以证实^[13]。本文利用 HPLC 对家兔血液及大鼠组织中苍艾挥发油主成分——丁香酚的含量进行测定,结果表明建立的检测方法为丁香酚在生物体内

的含量测定提供了可行手段。此外,采用家兔与大鼠 2 种实验动物分别对苍艾挥发油的体内吸收及组织分布进行研究,结果发现苍艾挥发油的体内过程一致性较高,具体表现为家兔经鼻吸收后,5 min 即达到峰浓度,而后血药浓度随时间的递增逐渐降低。同样地,大鼠经鼻给药后,5 min 时主要靶组织(心、脑、肺)中药物的浓度达到峰值;而主要代谢器官(肝、肾组织)中药物的浓度较低,30 min 时浓度较高,呈现出与血药浓度相似的趋势。表明苍艾挥发油经鼻腔吸收快,分布也快。且苍艾挥发油经大鼠鼻腔给药后,肝脏组织中药物浓度较低,说明了鼻腔给药的肝首过效应不明显。组织分布试验中,大鼠经鼻给药后,肺组织及脑组织中药物浓度较高,体现出了较好的肺靶向及透过血脑屏障能力,这些均为苍艾挥发油的后续研究提供了可靠的药理学依据。

[参考文献]

[1] 莫悉. 苍艾挥发油对肺气虚证大鼠免疫调节作用的研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2013.

[2] 陈柏君, 马云淑, 熊磊, 等. 苍艾香薰油的气相色谱——质谱分析[J]. 云南中医学院学报, 2011, 34(3): 13-16.

[3] 明溪, 熊磊. 苍艾香薰油急性毒性和刺激性试验研究[C]. 沈阳: 第 25 届全国中医儿科学术研讨会暨中医药高等教育儿科教学研究会, 2008.

[4] 明溪, 何晓山, 陈柏君, 等. 苍艾香薰油体外抑菌作用研究[J]. 云南中医学院学报, 2011, 34(1): 10-13.

[5] 明溪, 钟晓君, 杨江凤, 等. 苍艾香薰油空气消毒作用研究[J]. 云南中医学院学报, 2013, 36(2): 27-29.

[6] 明溪. 苍艾香薰油对上呼吸道常见致病菌的部分药效学研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2008.

[7] 莫镇涛, 方永奇. 鼻腔给药的优势及影响因素[J]. 今日药学, 2010, 20(7): 1-3.

[8] 李婷婷, 蒋学华. HPLC 测定大鼠血浆中的丁香酚[J]. 华西药理学杂志, 2011, 26(6): 587-589.

[9] 董芙蓉, 朱红霞, 刘莉, 等. 芷冰原位凝胶胶体内的药代动力学[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 144-147.

[10] 张莉华, 许新德, 邵斌, 等. 斑蝥黄微胶囊在家兔体内的药代动力学[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(4): 98-101.

[11] 李婷婷, 陈蓉, 曾文婷, 等. 丁香酚在大鼠体内的组织分布研究[J]. 中国药房, 2011, 23(7): 596-598.

[12] 赵静宜, 杜守颖, 陆洋, 等. 艾片经静脉和鼻腔给药的小鼠组织分布研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(7): 1071-1074.

[13] 邬伟魁, 张海燕, 宋伟, 等. 中药经鼻腔给药研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 288-293.

[责任编辑 刘德文]