

· 药物代谢 ·

# 基于色谱指纹图谱的苍术挥发油多成分体内药代动力学研究

陶野<sup>1,2</sup>, 张贝贝<sup>2</sup>, 付梅红<sup>2\*</sup>, 许海玉<sup>2</sup>, 方婧<sup>2</sup>, 王维皓<sup>2</sup>, 李德凤<sup>2</sup>, 张毅<sup>2</sup>, 杨洪军<sup>2\*</sup>

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:建立了茅苍术挥发油中 7 个成分的体内分析方法。方法:采用内标法测定了给药后不同时间点 7 个化合物的血药浓度,并通过 DAS 3.0 软件计算出药代动力学参数,以自定义各成分的权重系数进行茅苍术挥发油整合药代动力学研究,分别获得化合物 1~7 及其整合的血浆浓度-时间曲线,化合物 2~7 和整合的药代动力学参数。结果:整合药代动力学参数  $T_{1/2}$ ,  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $AUC_{(0-\infty)}$  和  $MRT_{(0-\infty)}$  分别为 8.01, 4.00 h, 3.84 mg·L<sup>-1</sup>, 42.31 mg·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, 11.65 h。结论:研究思路符合中药药作用特点,对多组分苍术挥发油的药代动力学做了一些初步的探索。

**[关键词]** 茅苍术挥发油; 内标法; 整合药代动力学

**[中图分类号]** R285.5, R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0156-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013110156

## Studies on Pharmacokinetics of Multi-constituents of Atractylis Oil based on Chromatographic Fingerprint

TAO Ye<sup>1,2</sup>, ZHANG Bei-bei<sup>2</sup>, FU Mei-hong<sup>2\*</sup>, XU Hai-yu<sup>2</sup>, FANG Jing<sup>2</sup>,  
WANG Wei-hao<sup>2</sup>, LI De-feng<sup>2</sup>, ZHANG Yi<sup>2</sup>, YANG Hong-jun<sup>2\*</sup>

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate pharmacokinetics process of the major components of *Atractylodes lancea* oil in rats. **Method:** A preliminary HPLC method based on internal standard method was employed to analysis 7 constituents simultaneously in plasma and to study their pharmacokinetics after oral administration of volatile oil from *A. lancea* in rats. Pharmacokinetic parameters of compound 2~7 were acquired by DAS 3.0 software and the integrative concentration-time curve was obtained based on the corresponding weighting coefficients. **Result:** Integrative pharmacokinetic parameters was as follows:  $T_{1/2}$  was 8.01 h,  $T_{max}$  was 4.00 h,  $C_{max}$  was 3.84 mg·L<sup>-1</sup>,  $AUC_{(0-\infty)}$  was 42.31 mg·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> and  $MRT_{(0-\infty)}$  was 11.65 h, respectively. **Conclusion:** This study was thought as an appropriate method for traditional Chinese medicine and we carried out some exploratory survey for pharmacokinetics of volatile oil from *A. lancea*.

**[Key words]** *Atractylodes lancea* oil; internal standard method; integrative pharmacokinetics

**[收稿日期]** 20121211(020)

**[基金项目]** 中国中医科学院基本科研业务费自主选题课题 (Z02063); 国家科技支撑计划项目 (2008BAI51B03)

**[第一作者]** 陶野,在读硕士,从事中药药代动力学研究, E-mail: taoye165298765@163.com

**[通讯作者]** \*付梅红,研究员, E-mail: hy\_xu627@163.com;

\*杨洪军,博士,研究员, Tel: 010-64014411, E-mail: hongjun0420@vip.sina.com

苍术为菊科植物茅苍术或北苍术的干燥根茎,具有燥湿健脾、祛风散寒、明目的功效,主要用于脘腹胀满,泄泻,食欲不振,水肿,脚气痿痹,风寒感冒,夜盲,眼目昏涩等症<sup>[1]</sup>,现代药理学研究表明苍术具有抗溃疡、抗心率失常、保肝、抗炎抗菌等药理作用<sup>[2]</sup>。

多成分及其整体药代动力学研究是中药药代动力学学科关键科学问题和难点问题<sup>[3]</sup>。近年来,对

三七总皂苷<sup>[4]</sup>、黄连提取物<sup>[5]</sup>、延胡索提取物<sup>[6]</sup>、复方荜草注射剂<sup>[7]</sup>、蟾酥提取物<sup>[8]</sup>等进行了体内多成分同时检测及其药代动力学研究,分析方法有 HPLC-UV, LC-MS, GC-MS 等。由于中药的有效成分不明确,对照品的缺乏以及一些化学物质不稳定等原因,至今中药没有被广泛接受的药代动力学研究方法,美国 FDA 也认识到用标准的药代动力学方法来研究植物药在动物体内的暴露在技术上也许并不可行<sup>[9]</sup>,因此采用符合中药多组分多靶点整体药效作用特征的中药药代动力学研究方法是十分必要的。

在本文中,以茅苍术挥发油为模型药物,采用多组分整合药代动力学的研究方法,采用内标法建立血浆中多成分半定量分析方法,从半定量角度描述灌胃给药后不同时间点血浆中茅苍术挥发油 7 个成分的血药浓度变化,并整合得到了血药浓度-时间曲线和药代动力学参数,从而描述茅苍术挥发油在体内的吸收、分布、代谢、排泄 (ADME) 过程。

## 1 材料

**1.1 仪器与试剂** 岛津 LC-20AT 型高效液相色谱仪 (日本岛津株式会社), GTR16-2 型高速离心机 (北京时代北利离心机有限公司), Vortex-6 型多功能旋涡混合器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

乙腈、甲醇为色谱纯 (美国 Fisher 公司), 水为高纯水 (自制), 联苯 (北京化工厂), 肝素钠 (国药集团化学试剂有限公司), 聚山梨醇酯-80 (吐温-80), (北京化工厂)。茅苍术购自湖北麻城, 经中国中医科学院中药研究所何希荣主管技师鉴定为菊科苍术属植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 的干燥根茎, 采用超临界流体萃取法提取得到茅苍术挥发油 (提取率为 11%)。

**1.2 实验动物** SD 大鼠, 清洁级, 雌雄各半, 体重 (220 ± 30) g, 由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 许可证编号 SCXK (军) 2007-0004。

## 2 方法与结果

**2.1 苍术挥发油的提取和供试品的制备** 将茅苍术药材粉碎, 过 40 目筛, 准确称取药材粉末 200 g, 装入超临界萃取装置的提取釜 II (容量为 250 g) 中进行萃取, 萃取工艺为萃取压力 25 mPa、萃取时间 1 h、萃取温度 35 °C、分离温度 40 °C, 得苍术挥发油, 挥发油提取率是 11.17%。

精密吸取茅苍术挥发油 10 mL 于研钵中, 加入

2 mL 的吐温-80, 待研磨充分后, 少量分次的加入水, 使其充分混合均匀至 100 mL, 得供试品溶液, 其生药质量浓度为 91 g·L<sup>-1</sup>。

**2.2 色谱条件** Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相 A 相为水相, B 相为乙腈, 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1。流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 280 nm, 柱温为 30 °C。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	B/%	A/%
0	7	93
5	20	80
30	33	67
40	44	56
43	45	55
55	50	50
67	35	45
70	55	45
75	100	0

**2.3 血浆样品的制备方法** 取血浆 100 μL, 加入内标溶液 (含 8 mg·L<sup>-1</sup> 联苯甲醇溶液) 10 μL, 加入甲醇 400 μL, 涡旋振荡 1 min, 于 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清溶液, 进样 50 μL, 进行 HPLC 分析。

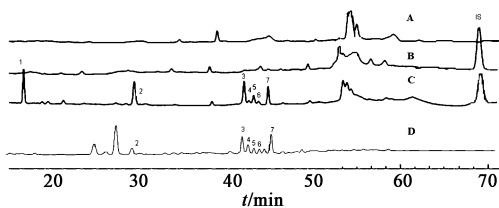
**2.4 药代动力学试验** SD 大鼠 20 只, 分成 2 组, 每组 10 只, 大鼠实验前禁食 12 h, 自由饮取水, 按照生药量为 0.91 g·kg<sup>-1</sup> 灌胃给予苍术挥发油, 第 1 组分别于给药后 0, 0.25, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 眼眶取血; 第 2 组分别于给药后 0, 0.5, 1.5, 3, 6, 10, 16 h 眼眶取血。每次取血 0.3 mL 于肝素管中, 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 得血浆样品, 于 -20 °C 保存。

**2.5 数据分析** 测定采用内标法, 血浆经 HPLC 测定获得各主要入血成分的峰面积与内标液峰面积的比值, 再乘以内标浓度即得各主要入血成分的相对浓度用  $\bar{x} \pm s$  表示。根据血浆中苍术挥发油主要成分给药后测得的血药浓度-时间数据, 采用 DAS 3.0 软件进行药代动力学分析, 计算药代动力学参数, 获得色谱峰 2, 3, 4, 5, 6, 7 的 AUC<sub>(0-∞)</sub> 数据。然后分别将化合物 2~7 的 AUC<sub>(0-∞)</sub> 在它们总和中所占比值, 自定义各自的权重系数 (ω<sub>j</sub>), 将每一时间点下化合物 2~7 的血药浓度赋以各自的权重系数, 获得整合血浆浓度-时间曲线和药动学参数。

**2.6 茅苍术挥发油入血成分分析和给药剂量的确定** 取 SD 大鼠空白血浆, 按 2.3 血浆样品处理项

下操作,不加内标,进样 50  $\mu\text{L}$ ,获得空白血浆样品色谱图;取 SD 大鼠空白血浆,按 2.3 血浆样品处理项下操作,进样 50  $\mu\text{L}$ ,获得空白血浆 + IS 色谱图;取 SD 大鼠给药后 2 h 的含药血浆,按 2.3 项下操作,进样 50  $\mu\text{L}$ ,获得含药血浆 + IS 色谱图;按照 2.1 苍术挥发油的提取得到挥发油,用甲醇稀释 100 倍,进样 20  $\mu\text{L}$ ,获得茅苍术挥发油色谱图,将空白血浆、给药血浆、茅苍术挥发油色谱图进行对比,结果表明,有 7 个入血成分,其保留时间分别为 18.16, 29.88, 41.51, 42.02, 42.57, 43.08, 44.11 min, 其中化合物 1 可能是代谢产物,化合物 2~7 可能来源于苍术挥发油的原型成分。见图 1。

将一定浓度的联苯甲醇液(内标溶液)加入到一定量的茅苍术挥发油中,甲醇定容至刻度。按照 2.2 色谱条件进行测定,按照内标法计算化合物 2~7 的相对浓度,分别得到化合物 2~7 的给药量为 15.05, 6.78, 3.45, 1.75, 1.46, 7.14  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。



A. 空白血浆 ;B. 空白血浆 + IS;  
C. 含药血浆 + IS;D. 茅苍术挥发油  
IS. 联苯 biphenyl;峰 1~7. 含药血浆包括 7 个色谱峰

图 1 茅苍术挥发油入血成分 HPLC 色谱

**2.7 方法的专属性** 按 2.3 项下血浆样品制备方法制备,分别获得不加内标的空白血浆色谱图(图 1-A),空白血浆 + IS 色谱图(图 1-B),含药血浆 + IS 色谱图(图 1-C),结果表明,空白血浆和含药血浆中没有干扰内标的测定,具有较好的专属性。

**2.8 精密度** 按 2.3 项下血浆样品制备方法制备含药血浆,在上述色谱条件下,连续进样 6 次,分别记录 1~7 号化合物的吸收峰的峰面积,并根据公式计算各成分的相对浓度及其 RSD。每次进样化合物 1~7 相对浓度的 RSD 分别为 1.53%, 0.92%, 2.11%, 5.43%, 3.94%, 5.12%, 2.27%, 仪器精密度良好。

**2.9 稳定性** 取血浆样品,按 2.3 项制备含药血浆,并于室温(25  $^{\circ}\text{C}$ )放置 0, 2, 4, 8, 10, 12, 24 h 以及冷冻放置 7 d 后解冻后进样分析,计算各化合物的相对浓度,化合物 1~7 相对浓度的 RSD 分别为 1.33%, 0.86%, 2.48%, 6.45%, 3.94%, 5.21%, 1.85%, 说明化合物在制备后 24 h 内稳定,血浆样

品冻存 7 d 后稳定。

**2.10 重复性** 取同一血浆样品 6 份,按 1.2.3 项下血浆样品制备方法制备 6 份,在上述色谱条件下测定,化合物 1~7 相对浓度的 RSD 分别为 0.77%, 6.52%, 4.65%, 5.52%, 3.35%, 6.69%, 4.60%, 说明该方法重复性良好。

**2.11 大鼠血浆中苍术挥发油 6 个原型成分的  $\text{AUC}_{(0-\infty)}$  及其自定义权重系数( $\omega_j$ )和整合浓度的计算** 大鼠灌胃生药量为 0.91  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  苍术挥发油,化合物 1 可能是代谢产物,没有确定它的原型药物,故未进行药代动力学计算。根据化合物 2~7 的血药浓度分别计算出各自的  $\text{AUC}_{(0-\infty)}$ ,再以 2.5 数据分析项中自定义权重系数( $\omega_j$ )计算方法各成分相应的权重系数,见表 2。从结果中可以看出,各化合物的权重系数( $\omega_j$ )大小依次为化合物 3 > 化合物 5 > 化合物 2 > 化合物 7 > 化合物 6 > 化合物 4。

表 2 大鼠口服给茅苍术挥发油后化合物 2~7 的  $\text{AUC}_{(0-\infty)}$  及其自定义权重系数

药动学参数	化合物					
	2	3	4	5	6	7
$\text{AUC}_{(0-\infty)}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$	31.79	70.03	0.35	36.87	0.51	22.91
权重系数/ $\omega_j$	0.196	0.431	0.002	0.227	0.003	0.141

**2.12 血浆中苍术挥发油主要成分及其整合的浓度-时间曲线和药代动力学参数** 化合物 1~7 以不同时间点的平均血药浓度进行绘制,整合浓度通过不同时间的化合物 2~7 的平均血药浓度乘以各自的权重系数计算得到,各自血药浓度-时间曲线见图 2。同样,以平均血药浓度进行药代动力学参数计算,其结果见表 3。

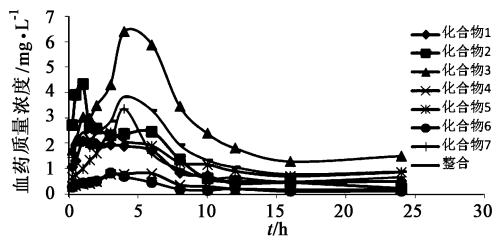


图 2 大鼠灌胃 0.91  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  苍术挥发油后 7 个化合物和整合的平均血药浓度-时间曲线( $n=10$ )

从表 3 中可以看出,化合物 2~7 的药代动力学参数差异性比较大,如化合物 6 的  $T_{1/2}=24.38$  h,而化合物 3 的  $T_{1/2}=6.87$  h;化合物 4 的  $T_{max}=6.00$  h,而化合物 2 的  $T_{max}=6.00$  h;化合物 3 的  $C_{max}=6.40$   $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,而化合物 4 的  $C_{max}=0.81$   $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;化合物 3 的  $\text{AUC}_{(0-\infty)}=70.03$   $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ,而化合物 4 的

表3 大鼠灌胃 0.91 g·kg<sup>-1</sup>苍术挥发油后 6 个化合物和整合的主要药代动力学参数(n=10)

药动学参数	化合物						整合数据
	2	3	4	5	6	7	
$T_{1/2}/h$	10.11	6.87	8.17	8.54	24.38	16.14	8.01
$T_{max}/h$	1.00	4.00	6.00	3.00	3.00	4.00	4.00
$C_{max}/mg \cdot L^{-1}$	4.33	6.40	0.81	2.42	0.83	3.36	3.84
$AUC_{(0-\infty)}/mg \cdot L^{-1} \cdot h$	31.79	70.03	0.35	36.87	0.51	22.91	42.31
$MRT_{(0-\infty)}/h$	10.34	11.05	11.62	13.73	28.88	18.28	11.65

$AUC_{(0-\infty)} = 0.35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。中药是多个成分综合作用的结果,但是各个成分药代动力学特征差异比较大,在本文中参照文献[10]的整合方法进行整合,得到整合药动学参数  $T_{1/2}$ ,  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $AUC_{(0-\infty)}$ ,  $MRT_{(0-\infty)}$  分别为 8.01, 4.00 h, 3.84  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 42.31  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 11.65 h。

### 3 讨论

**3.1 HPLC 色谱条件的优化** 考察了不同的流动相体系,结果表明,以乙腈-水为流动相时基线平稳且样品分离效果好且保留时间短,故选择乙腈-水系统作为流动相。选用了 2 根不同厂家的色谱柱,比较分离度、峰型和柱效,结果表明 Diamonsil C<sub>18</sub>(2) 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)较为合适。在 280 nm 下检测,基线相对平稳,各色谱峰响应值较好且分离度好,说明这 7 个峰在 280 nm 建立灵敏度相对比较高。

**3.2 样品前处理方法的考察** 考察甲醇、乙腈、甲醇-乙腈(1:1)等溶剂对同一份含药血浆样品进行蛋白质直接沉淀法,最后发现甲醇的处理效果比较好。然后依次考虑了甲醇用量,最终确定的血浆样品的制备方法为 4 倍量甲醇沉淀蛋白的方法。

王广基教授提出了基于 AUC 自定义权重系数“中药多组分整合药代动力学”研究的理论<sup>[10]</sup>,本文也采用了该整合机制,但是笔者认为在“组效关系”<sup>[11]</sup>的指导下进行中药多组分的整合药代动力学将会更加符合中药的作用特点。

现代分析仪器技术被广泛应用到中药药代动力学研究,例如 LC-MS、GC-MS、UPLC 等,提高了中药药代动力学的研究水平。但是,中药药代动力学依然面临着许多困境及其难点,需要从分析策略上探讨中药药代动力学研究,对于药效成分明确的中药及其复方,可以对主要药效成分进行药代动力学研究,然而大多数中药及其复方的药效物质基础还不明确,测定 1~2 个或者少数几个化学成分显然不符合中药的作用特点,所以本研究中采用内标法,对灌胃苍术挥发油后血浆中 7 个化学成分进行半定量分

析,获得 7 个成分的血药浓度-时间曲线,并计算药代动力学参数,对解决当前中药药代动力学分析方法上的技术问题,例如对照品的缺乏、同时测定血浆中多个成分的药代动力学方法难以建立等,有一定的参考价值,值得进一步的深入研究。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [2] 付梅红,朱东海,方婧,等. 苍术的化学、分子生药学和药理学研究进展[J]. 中国中药杂志,2009, 34(20): 2669.
- [3] 郝海平,郑超涌,王广基. 多组分、多靶点中药整合药代动力学研究的思考与探索[J]. 药学学报,2009, 44(3): 270.
- [4] 陈钢,牧磊,张晓,等. 三七总皂苷多成分经鼓室给药的体内分布及药代动力学研究[J]. 中国中药杂志,2011, 36(13):1815.
- [5] 鲍天冬,李玉洁,杨庆,等. LC/MS 测定大鼠灌胃黄连提取物后血浆中小檗碱、巴马汀及其药物动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(13):186.
- [6] 胡楠,梁日欣,王岚,等. 延胡索提取物在大鼠血浆中的药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17(4): 186.
- [7] 黄勇,何峰,张治蓉,等. HPLC-MS-MS 同时检测大鼠血浆中荜茇素、牡荆素和槲皮苷[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1): 80.
- [8] 刘冬,杜守颖,何秀峰,等. 蟾酥提取物中 2 种蟾酥甾烯类成分兔体内药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):135.
- [9] FDA. Guidance for Industry, Botanical drug products [S]. 2004.
- [10] 李晓宇,郝海平,王广基,等. 三七总皂苷多效应成分整合药代动力学研究[J]. 中国天然药物,2008, 6(5): 377.
- [11] 许海玉,唐仕欢,陈建新,等. 基于代谢组学的中药“组效关系”研究思路与策略[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2011, 13(1): 30.

[责任编辑 邹晓翠]