

# 四逆散有效成分芍药苷药代动力学研究

刘东锋<sup>1</sup>, 张 莉<sup>2</sup>, 陈 婷<sup>1,2</sup>

(1 中国药科大学中药复方研究室, 江苏 南京 210038;

2 南京大学生命科学学院医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

**摘要:**目的: 比较中药复方四逆散中芍药苷与其单体形式之间药动学行为的差异, 探讨复方配伍后对芍药苷药动学的影响。方法: 采用反相高效液相法, 紫外检测; 3P97 药代动力学软件拟合药动学模型。结果: 发现复方配伍后芍药苷的生物利用度显著降低。提示芍药苷可能不仅以原形药的形式发挥药理作用, 还存在经肠道菌群和肝药酶作用后的活性代谢物; 配伍组方后其它化学成分促进了芍药苷的代谢转化。这对研究中药复方各种成分对药物代谢动力学的影响是有一定意义的。

**关键词:** 四逆散; 芍药苷; 药代动力学; 反相高效液相色谱

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)02-0036-03

## Pharmacokinetics Study on Paeoniflorin in Sini San

LIU Dongfeng<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>2</sup>, CHEN Ting<sup>1,2</sup>

(1 Department of TCM Research, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China; 2 State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

**Abstract:** Objective: To compare pharmacokinetics between monocase paeoniflorin and that in Si Ni San and discuss the change on pharmacokinetic parameters affects by other components. Methods: Paeoniflorin in plasma was determined by RP-HPLC with UV detector. The concentration-time data were fitted using 3P97 pharmacokinetics program. Results: Bioavailability of Paeoniflorin in Si Ni San was significantly decreased compared with its monomer, which indicates Paeoniflorin takes pharmacological action besides itself, possibly in metabolites by intestinal bacteria and liver, promoted by the other components in Si Ni San. The result may has a certain significance on pharmacokinetics affected by other components in a TCM compound prescription.

**Key words:** Si Ni San; Paeoniflorin; Pharmacokinetics; RP-HPLC

芍药苷 paeoniflorin (PF) 是经方理气剂四逆散的主要有效成分之一, 具有扩张冠状动脉, 增加冠脉流量, 对抗急性心肌缺血, 抑制血小板聚集, 降低血压和对抗 KA 所致兴奋性神经损伤<sup>[1-3]</sup> 等广泛的药理作用。阐明四逆散中芍药苷在机体内的药代动力学行为, 有助于指导复方临床应用以及探讨芍药苷在全方发挥药理作用中的地位 and 机制。本研究应用反相高效液相法 (RP-HPLC) 测定了单体芍药苷及四逆散中芍药苷的血浆药物浓度, 对大鼠一次灌胃芍药苷单体和四逆散后的药代动力学进行了比较研究, 初步探讨了中药复方配伍后对有效成分的药代动力

学行为的影响。

## 1 材料

**1.1 仪器** Waters600 高效液相色谱仪、工作站, Waters2487 双波长紫外检测器。

**1.2 药品与试剂** 北柴胡、白芍、甘草、枳实购自安徽亳州药材市场, 经中国药科大学药学教研室余伯阳教授鉴定。北柴胡为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 炮制去皮的干燥根, 白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根, 甘草为豆科植物 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎。枳实为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥幼果。四逆散为本实验室自制, 芍药苷含量为 1.0%。芍药苷自制 (经 HPLC 检测归一法含量 97.2%)。乙腈为 Merck 产品, 水为纯净水, 其余均为国产分析纯。

**1.3 实验动物** 普通雄性大鼠 12 只, 购自南京中

收稿日期: 2004-04-09

基金项目: 国家自然科学基金资助 (No. 90209040)

通讯作者: 刘东锋, Tel: (025) 85274926, 13770574640, E-mail:

njczplant@163.com

医药大学动物养殖中心。以体重随机分为两组,即 A 组芍药苷灌胃 100mg/kg 和 B 组四逆散 10g/kg, 两组体重分别为(168.50 ± 3.99), 168.00 ± 5.06) g 差异无显著统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 固定相: YMC ODS-C<sub>18</sub> 柱(150mm × 4.6mm, 5μm), 流动相: 乙腈-水梯度系统(0min: 5: 95; 5min: → 15: 85; 10min: → 20: 80; 15min: → 25: 75); 流速: 1.0mL/min; 柱温: 25℃; 检测波长: 230nm; 灵敏度: 0.01AUFS。采用外标法定量测定血浆芍药苷浓度。见图 1。

**2.2 标准液配制** 精密称取芍药苷标准品 10.70mg, 以甲醇溶解于 100mL 容量瓶中, 制成 107.00mg/L 的标准母液, -20℃ 保存待用。

**2.3 血浆样品的预处理方法** 取待测大鼠全血, 即时离心制备血浆。微量加样器精密吸取 100μL 置离心管中, 加 1.5mL 甲醇, 超声 20min, 3000r 离心 5min。精密吸取 1.0mL, 45℃ 水浴 N<sub>2</sub> 吹干, 加流动相 50μL 溶解, 超声 5min, 3000r 离心 5min, 吸取上清液 20μL 进样。

**2.4 线性范围** 芍药苷标准溶液用空白大鼠血浆配制血浆芍药苷浓度分别为 42.80~ 2568.00μg·L<sup>-1</sup> 的 7 个含药血浆标准管。按血浆样品进行预处理, HPLC 测定, 记录峰面积(A<sub>PF</sub>), 每个浓度测定 3 次, 经 Q 检验, 各浓度点 A<sub>PF</sub> 无逸出值。计算各浓度点平均值, 以 A<sub>PF</sub> 作为纵坐标, 以血浆芍药苷浓度 C<sub>PF</sub> 为横坐标, 进行线性回归, 得标准曲线方程。血浆芍药苷浓度在 42.8~ 2568.00μg L<sup>-1</sup> 的范围内, 芍药苷峰面积与血浆芍药苷浓度间呈良好的线性关系, 可满足动物实验定量分析的要求。回归方程:  $A_{PF} = 23.935C_{PF} + 56.597$ , 相关系数:  $r = 0.9989$ 。

**2.5 检测限** 制备芍药苷浓度为 1, 2, 5, 8, 10, 15,

20μg·L<sup>-1</sup> 的含药大鼠血浆, 预处理后进样, 以信噪比(S/N) 为 3 时的芍药苷血浆浓度判为本分析方法的检测限。结果表明芍药苷浓度 5μg·L<sup>-1</sup> 的含药大鼠血浆的 HPLC 色谱图符合 S/N= 3 的条件, 故确定本法的检测限为芍药苷血浆浓度 5μg·L<sup>-1</sup>。

**2.6 回收率测定法** 制备芍药苷浓度为 42.80, 1712.00, 2568.00μg·L<sup>-1</sup> 含药血浆, 按血浆预处理方法处理, 以该低中高 3 个浓度为 1 组, HPLC 测定, 在 1 日内共测定 4 次, 根据标准曲线计算 PF 浓度实测值(C'<sub>PF</sub>), 回收率 = C'<sub>PF</sub>/C<sub>PF</sub>, 本法所测为日内回收率。见表 1。

**2.7 日内、日间精密度测定法** 制备芍药苷浓度为 42.80, 1712.00, 2568.00μg·L<sup>-1</sup> 的含药血浆, 以该低中高 3 个浓度为 1 组, 在 1 日内测定 5 次, 计算 A<sub>PF</sub> 的平均值  $\bar{x}$  和标准偏差 s, 计算相对标准偏差 RSD = s/ $\bar{x}$ , 结果为日内精密度。在 5 日内不同天内测定 5 次, 计算 RSD, 结果为日间精密度。见表 1。

**2.8 专一性** 芍药苷峰与大鼠血浆内源性物质、四逆散吸收入血的其他成分峰及其代谢产物峰均实现基线分离。大鼠灌胃四逆散后的含芍药苷血浆经过预处理后加入芍药苷标准液, 只有芍药苷保留时间(13.20 ± 0.08) min 处的色谱峰特异性增高, 峰面积增加量与所加芍药苷量成正比, 表明本法专一性良好。

**2.9 给药及采血方法** 大鼠禁食 12h, 灌胃给药, 给药前取空白血浆, 给药后分别于 10、20、40、60、90、120、180、240、300、360min 眼眶取血 0.5mL, 加肝素抗凝即时分离血浆, -20℃ 保存待测。

**2.10 药动学研究方法与统计方法** HPLC 测定芍药苷经时血浆浓度, 采用中国药理学学会数学药理委员会编制的 3P97 实用药代动力学软件, 拟合药代动力学模型, 计算药代动力学参数。数据采用组间对照 t

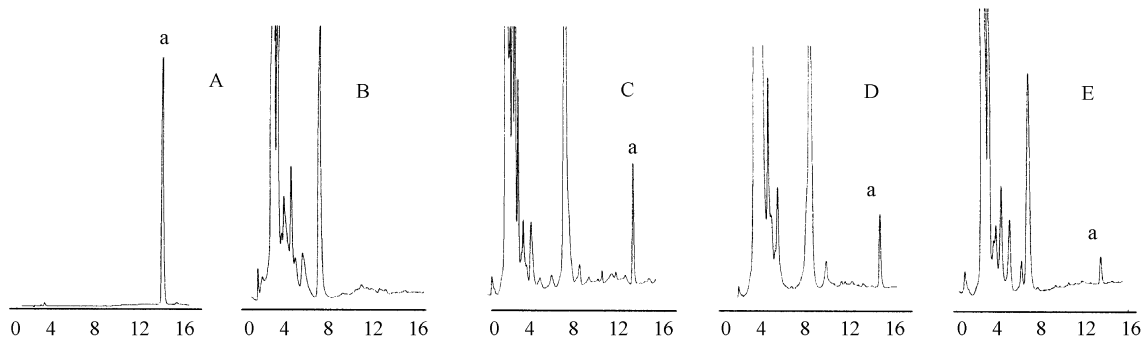


图 1 HPLC 色谱图

A. 芍药苷标准品; B. 空白大鼠血浆; C. 空白大鼠血浆加入芍药苷标准品; D. 大鼠灌胃芍药苷单体 90min 时点血浆; E. 大鼠灌胃四逆散 90min 时点血浆 a. 芍药苷的色谱峰

检验法进行统计学分析处理。

表 1 回收率与标准偏差

浓度( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	回收率(%)	日内平均偏差(%)	日间平均偏差(%)
42.80	103.79 ± 1.67	3.44	3.68
1712.00	94.68 ± 1.79	2.46	2.54
2568.00	102.10 ± 1.09	1.98	2.12

2.11 大鼠 1 次灌胃芍药苷和四逆散的药代动力学结果 大鼠 1 次灌胃芍药苷和四逆散的药代动力学模型均符合一室开放模型, 两组主要药代动力学参数见表 2。

表 2 大鼠灌胃四逆散及芍药苷单体后芍药苷的药代动力学参数

药代参数	四逆散组	芍药苷组
$K_a/\text{min}^{-1}$	0.85 ± 0.26	0.39 ± 0.10
$K_e/\text{min}^{-1}$	0.0026 ± 0.0007	0.0017 ± 0.0007
$t_{1/2K_a}/\text{min}$	18.25 ± 17.30	3.42 ± 1.57
$t_{1/2K_e}/\text{min}$	381.82 ± 91.35	518.42 ± 132.22
$t_{\text{peak}}$	34.38 ± 26.78	22.31 ± 8.28
$C_{\text{max}}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	250.45 ± 36.17	640.18 ± 125.86
$\text{AUC}_{0-\infty}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	0.1447E ± 26184.74	0.4739E ± 0.1488E <sup>1)</sup>

注:  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ , 两组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

中药复方中芍药苷的血浆 HPLC 测定方法报道较少, 其关键是样品的预处理。我们根据其理化性质和文献报道<sup>[4]</sup>, 曾选用乙酸乙酯萃取, 大孔树脂吸附等方法, 但转移率较低(40%、60%) 难以满足实验要求。最终确定采用甲醇直接沉淀蛋白,  $\text{N}_2$  吹干的方法, 既提高了精密度又增加了灵敏度, 操作简便快速, 所用血浆量少, 可供其它中药复方药动力学研究参考。

试用间羟基苯甲酸、水杨酸等作为内标物<sup>[5]</sup>, 但需加入一定比例的醋酸以改善峰形, 而在此条件下芍药苷有较明显的分解, 标准品色谱图上出现若干杂质峰, 且标准曲线各浓度点的峰面积标准差太大, 精密度无法达到定量的要求, 故采用外标法定量。有研究报道, 白芍和甘草配伍较白芍单用可显著增加芍药苷在小鼠体内的吸收<sup>[6]</sup>。而我们的实验表明, 复方四逆散中所含芍药苷相对单体而言, 半吸收系数显著降低而半消除系数显著升高, 同时  $\text{AUC}_{0-\infty}$  明显降低( $P < 0.01$ )。该结果提示, 四逆散配伍组方

后芍药苷的生物利用度大幅度下降(70%)。根据文献<sup>[7,8]</sup>, 芍药苷经肠内菌代谢后可产生 3 个代谢物, 其中芍药代谢素 I (PM-1) 比芍药苷在拮抗遗传性癫痫  $E_i$  小鼠的中枢性痉挛和戊四唑痉挛方面作用更强, 我们推测在四逆散全方中化合物芍药苷可能不仅以原形药的形式发挥药理作用, 还存在经肠道菌群和肝药酶作用后的活性代谢物; 复方配伍后方中其它化学成分促进了芍药苷的代谢转化, 从而降低了血浆中原形药的浓度; 或有其他原因, 有待进一步研究确证。

通过实验研究首次发现了中药复方四逆散中芍药苷与其单体形式之间体内药代动力学有显著差异, 这对研究中药复方各种成分对药物代谢动力学的影响是有一定意义的。

### 参考文献:

- [1] 王朝虹, 闵知大. 芍药化学成分及药理研究[J]. 时珍国医国药, 1999, 10(7): 544-546.
- [2] Ye Jinfeng, Duan Huilong, Yang Xiaoming, et al. Antithrombosis effect of paeoniflorin: Evaluated in a photochemical reaction thrombosis model in vivo [J]. Planta Med, 2001, 67(8): 766-768.
- [3] 吴玉梅, 徐汉鹏, 王春婷, 等. 芍药苷对培养小鼠皮层神经元的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2002, 16(3): 172-175.
- [4] 张壮, 闫彦芳, 陈可冀. 川芎赤芍配伍比例对芍药苷药代动力学的影响[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(11): 688-691.
- [5] 蒋学华, 刘世瑞, 徐萍. 反相高效液相色谱法测定血浆中芍药苷的含量[J]. 中成药, 1993, 15(2): 29-30.
- [6] Chen Lihchi, Chou Meimei, Lin Mingfang, et al. Pharmacokinetics of paeoniflorin after oral administration of Shao Yao Gan Cao Tang in mice [J]. Japanese journal of pharmacology, 2002, 88(3): 250-255.
- [7] Massao Hattori, Yue Zhongshu, Mineo Shimizu, et al. Metabolism of paeoniflorin and related compounds by human intestinal bacteria [J]. Chem. Pharm. Bull, 1985, 33(9): 3838-3846.
- [8] Ola Ahmed Heikal, Teruaki Akao, Shuichi Takeda, et al. Pharmacokinetic study of paeonimetabolin, a major metabolite of paeoniflorin from paeony roots [J]. Pharm. Bull, 1997, 20(5): 517-521.