

• 药理 •

# 川芎赤芍配伍比例对阿魏酸在麻醉犬体内药代动力学的影响\*

张 壮<sup>1</sup>, 刘 楠<sup>1</sup>, 陈可冀<sup>2</sup>, 闫彦芳<sup>1</sup>

(1 北京中医药大学中医内科学教育部重点实验室, 北京 100700;

2 中国中医研究院西苑医院, 北京 100091)

**摘要:**目的: 探索中药配伍比例对中药复方中的药效成分药代动力学特征的影响。方法: 采用反相高效液相色谱法紫外检测阿魏酸血清药物浓度, 3P87 药代动力学软件拟合药代动力学模型, 统计学处理采用 *t* 检验法。结果: 川芎: 赤芍 1: 2 和 2: 1 芍药制剂给予麻醉犬灌胃  $5\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  后阿魏酸的药代动力学过程均符合一室开放模型, 川芎: 赤芍 1: 2 和 2: 1 组的药代动力学参数分别为  $Ka = 0.111 \pm 0.035(\text{min}^{-1})$  和  $0.075 \pm 0.020(\text{min}^{-1})$ ,  $Ke = 0.013 \pm 0.004(\text{min}^{-1})$  和  $0.016 \pm 0.002(\text{min}^{-1})$ ,  $t_{1/2Ka} = 6.701 \pm 1.926(\text{min})$  和  $9.735 \pm 2.377(\text{min})$ ,  $t_{1/2Ke} = 61.306 \pm 23.531(\text{min})$  和  $44.254 \pm 5.518(\text{min})$ ,  $t_{\text{peak}} = 24.915 \pm 5.307(\text{min})$  和  $29.339 \pm 4.101(\text{min})$ ,  $c_{\text{max}} = 557.797 \pm 172.903(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$  和  $1509.518 \pm 275.813(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ ; 两组间药代动力学参数  $Ka$  与  $t_{1/2Ka}$  的差异具有显著统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 川芎赤芍配伍比例对阿魏酸的药代动力学特征具有显著影响, 揭示中药配伍比例的差异有时会导致其中某一种成分的药代动力学特征的变化。

**关键词:** 阿魏酸; 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)03-0028-04

## Effects of Chuanxiong-Chishao Dispensing Ratio on the Pharmacokinetics of Ferulic Acid in Canine

ZHANG Zhuang<sup>1</sup>, LIU Nan<sup>1</sup>, CHEN Keji<sup>2</sup>, YAN Yanfang<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Chinese Internal Medicine, Ministry of Education, Beijing University of

Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

2. Xiyuan Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100091, China)

**Abstract** Objective: To explore the effects of dispensing ratio of Chinese herbs on the pharmacokinetics characteristics of effective component. Methods: Ferulic Acid (FA) in serum was determined by RP-HPLC with UV-detector. The concentration-time data were fitted using 3P87 Pharmacokinetic Program, and the pharmacokinetic parameters were compared by *t*-test. Results: By administering Xiongshao preparation of  $5\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  intragastrically, the concentration-time curves of FA in canine groups of Chuanxiong: Chishao= 1: 2 and Chuanxiong: Chishao= 2: 1 both fitted to open one-compartment model. Parameters of Chuanxiong: Chishao= 1: 2 and Chuanxiong: Chishao= 2: 1 group were:  $Ka = 0.111 \pm 0.035(\text{min}^{-1})$  and  $0.075 \pm 0.020(\text{min}^{-1})$ ,  $Ke = 0.013 \pm 0.004(\text{min}^{-1})$  and  $0.016 \pm 0.002(\text{min}^{-1})$ ,  $t_{1/2Ka} = 6.701 \pm 1.926(\text{min})$  and  $9.735 \pm 2.377(\text{min})$ ,  $t_{1/2Ke} = 61.306 \pm 23.531(\text{min})$  and  $44.254 \pm 5.518(\text{min})$ ,  $t_{\text{peak}} = 24.915 \pm 5.307(\text{min})$  and  $29.339 \pm 4.101(\text{min})$ ,  $c_{\text{max}} = 557.797 \pm 172.903(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$  and  $1509.518 \pm 275.813(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$  accordingly. The differences of pharmacokinetic parameters  $Ka$  and  $t_{1/2Ka}$  between the two groups were statistically significant ( $P < 0.05$ ). Conclusion: The difference in dispensing ratio of herbs in Chinese formulae may result in changes of the pharmacokinetic characteristics of the components.

**Key words:** Ferulic acid; Pharmacokinetics; RP-HPLC

收稿日期: 2004-12-28

基金项目: 国家科委九五攻关课题(96-906-06-01)

通讯作者: 张壮, Tel: (010) 840313190, E-mail: liyuebj@sohu.com

阿魏酸(Ferulic acid, FA)为活血化瘀中药复方芍药制剂的主要成分, 本研究应用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定阿魏酸的血清药物浓度, 对犬一次灌胃川芎赤芍不同配伍比例的芍药制剂中阿魏

酸的复方药代动力学进行比较研究,进一步探索中药配伍比例对复方中药效成分的药理学特征的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 仪器** 岛津 LC-6A 高效液相色谱仪, C-R3A 数据处理仪, SPD-6AV 可变波长紫外可见检测器组成系统。

**1.1.2 药品与试剂** 川芎、赤芍原药材购自四川省药材公司,经西北大学胡正海教授鉴定,所购川芎为伞形科植物川芎 (*Ligusticum Chuanxiong* Hort.) 的干燥根;赤芍为毛茛科植物川赤芍 (*Paeonia veitchii* Lynch.) 的干燥根。川芎:赤芍 2:1 和川芎:赤芍 1:2 芍药制剂由中国中医研究院西苑医院制剂室采用水醇法制备,浓度相当于生药  $1\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,经 HPLC 测定川芎:赤芍 2:1 和川芎:赤芍 1:2 芍药制剂中阿魏酸含量分别为  $0.40\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $0.19\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。阿魏酸标准品,购自中国药品生物制品研究所,批号:773-9203,经 HPLC 检测鉴定为单一色谱峰。香豆素标准品,购自中国医药公司北京采购供应站,批号:880615,经 HPLC 检测鉴定为单一色谱峰。巴比妥钠,上海化学试剂采购供应站分装厂,UNION 进口分装,批号:860122。高效液相色谱流动相所用甲醇、冰醋酸及三氯乙酸等均为国产分析纯,水为三蒸水。

**1.1.3 实验动物** 杂种犬 12 只,均为雄性,第四军医大学西京医院实验动物中心提供。以体重分层随机分为两组,即 A 组川芎:赤芍 2:1 芍药制剂灌胃  $5\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  和 B 组川芎:赤芍 1:2 制剂灌胃  $5\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ,两组体重分别为  $17.38\pm 1.66(\text{Kg})$  和  $17.57\pm 2.06(\text{Kg})$ ,差异无显著统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 1.2 方法

**1.2.1 色谱条件** 固定相: Hypersil ODS<sub>2</sub> C<sub>18</sub> 柱 (150mm × 4.6mm, 5 $\mu\text{m}$ ), 流动相: 甲醇-水 (72: 28, v/v), 冰醋酸精调 pH= 3.22, 使用前混匀, 超声波脱气 10min 使用。流速:  $0.8\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 柱温 20~ 25 $^{\circ}\text{C}$ , 检测波长: 320nm, 灵敏度: 0.01AUFS。采用内标法定量测定血清阿魏酸浓度, 内标为香豆素。在此条件下, 保留值  $t_{R(\text{FA})} = 14.86\pm 0.12(\text{min})$ ;  $t_{R(\text{INS})} = 17.68\pm 0.18\text{min}$ 。

**1.2.2 标准液配制** 精密称取阿魏酸标准品 5.160mg, 置于 100mL 容量瓶中, 加入 5mL 甲醇溶解后, 加三蒸水至刻度, 成为  $51.60\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的储备液, 分装于密封试管中, -20 $^{\circ}\text{C}$  冰冻保存。每日使用前解

冻, 置室温 2h, 以移液管精确稀释配置为 34.40、17.20、12.90、8.60、4.30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的标准溶液待用。在整个配置、保存、稀释、待用、使用过程中严格避光, 以避免受光分解, 影响测定的准确性。

精密称取香豆素标准品 2.740mg, 置于 100mL 容量瓶中, 加入 5mL 甲醇溶解后, 加三蒸水至刻度, 成为  $27.40\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的储备液, 分装于密封试管中, -20 $^{\circ}\text{C}$  冰冻保存, 每日使用前取出, 置于室温 2h 后, 以移液管精确稀释配置为  $2.74\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的标准溶液待用。

**1.2.3 血清样品的预处理方法** 取尖底玻璃离心试管, 分别加入香豆素标准液  $2.74\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  各 10 $\mu\text{L}$ , 氮气吹干, 微量加样器分别取芍药制剂灌胃给药后各时点的待测含药犬血清 300 $\mu\text{L}$  加入试管中, 旋混 90s, 精取 10% 三氯乙酸 150 $\mu\text{L}$  加入试管, 旋混 60s,  $3000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10min, 取上清液 250 $\mu\text{L}$ , 置于玻璃试管中, 密封避光待测, 于 2h 内完成 HPLC 测定。HPLC 测定时, 微量进样器精取 100 $\mu\text{L}$  进样。

**1.2.4 线性范围** 用取尖底玻璃离心试管, 分别加入 FA 标准液 51.60、34.40、17.20、12.90、8.60、4.30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  各 10 $\mu\text{L}$ , 再分别加入香豆素标准液  $2.74\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  各 10 $\mu\text{L}$ , 氮气吹干, 微量加样器取混合空白犬血清 300 $\mu\text{L}$  配制成 FA 血清浓度分别为 143.33~1720.00 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的含药血清标准管。按血清样品预处理方法进行预处理, HPLC 测定, 共测定 5 组含药血清标准管。测得 FA 峰面积 ( $A_{\text{FA}}$ ) 与香豆素峰面积 ( $A_{\text{INS}}$ ) 的比值 A, 经 Q 检验, 无逸出值。以比值 A 为纵坐标, 以血清 FA 浓度 ( $C_{\text{FA}}$ ) 为横坐标, 进行线性回归, 得标准曲线方程及相关系数  $r$ 。

**1.2.5 检测限** 以 FA 血清浓度为 10~50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  犬血清, 预处理后进样, 以信噪比 (S/N) 为 3 时的 FA 血清浓度为本分析方法的检测限。

**1.2.6 回收率测定法** 制备 FA 血清浓度 (理论值 C) 为 334.00、458.67、1376.00 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 3 个为 1 组的高中低浓度系列含药犬血清, 在 10d 内分别做 5 组, 按血清预处理方法处理, HPLC 测定, 根据标准曲线计算 FA 浓度 (实测值  $C'$ ), 回收率  $\text{RC} = C'/C$ , 本法所测为日间回收率。

**1.2.7 日内、日间精密度测定法** 制备血清 FA 浓度为 334.00、458.67、1376.00 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  3 个为 1 组高中低浓度系列含药犬血清, 按血清预处理方法处理, HPLC 测定, 在 1d 内测定 6 组, 测定  $A_{\text{FA}}/A_{\text{INS}}$  的比值 A, 计算 A 的平均值  $\bar{x}$  和标准偏差 SD, 计算相对标准

偏差  $RSD = SD/\bar{x}$ , 结果为日内差。在 10 日内不同天内重复测定 6 次, 计算 RSD, 结果为日间精密度。

**1.2.8 给药及取血方法** 犬禁食 12h, 3% 戊巴比妥钠 30mg/kg 静脉麻醉, 插管灌胃给药剂量为  $5g \cdot Kg^{-1}$ , 给药浓度相当于生药  $1g \cdot mL^{-1}$ 。右侧股静脉插管取血, 于给药前取空白血清 2mL, 于给药后 5、10、20、30、45、60、120、180、240min 不同时点取血 2mL, 分离血清,  $-20^{\circ}C$  保存待测。

**1.2.9 药动学模型拟合与选择** 采用中国药学会数学药理委员会编制的 3P87 实用药代动力学软件, 微机处理 FA 经时血清浓度, 自动拟合药代动力学模型, 计算药代动力学参数。以  $F$  检验对一次权重的三种房室模型进行方差分析, 以赤池氏信息判据 AIC (Aikake's Information Criterion)、拟合优度 GF (Goodness of Fit)、确定系数  $R^2$  (R Square)、回归系数  $r$  (Regression Coefficient)、血药浓度最大相对误差 ME% (Maximum Relative Error of Concentration) 等指标为依据来判定药动学房室模型。

**1.2.10 统计学方法** 两组药动学数据采用组间对照  $t$  检验法进行统计学分析处理。

## 2 实验结果

### 2.1 色谱图 见图 1。

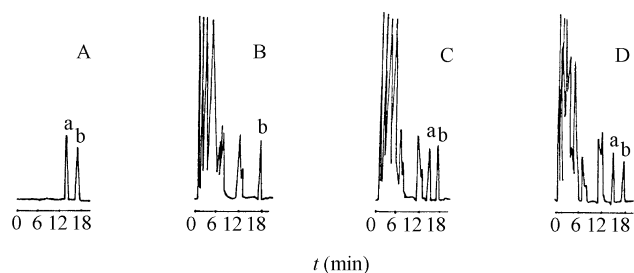


图 1 HPLC 色谱图

A. 阿魏酸与香豆素标准液混合进样; B. 空白犬血清加入香豆素; C. 空白犬血清加入阿魏酸与香豆素; D. 芍药制剂灌胃 20min 血清加入香豆素;  
a. 为阿魏酸的色谱峰; b. 为内标香豆素的色谱峰

### 2.2 专一性

阿魏酸峰与内标香豆素峰、犬血清内源性物质、芍药制剂吸收入血的其他成分峰及其代谢产物峰均实现基线分离。犬灌胃芍药制剂后的阿魏酸含药血清经过预处理后的上清液中加入阿魏酸标准液, 只有保留时间  $14.86 \pm 0.12$  (min) 处的色谱峰特异性增高, 峰面积增加值与所加阿魏酸量成正比, 表明本法专一性良好。

### 2.3 线性范围与标准曲线

FA 血清浓度在  $143.33$

$\sim 1720.00 \mu g \cdot L^{-1}$  的范围内, 峰面积比值 A 与 FA 血清浓度  $C_{FA}$  间线性关系良好, 标准曲线方程  $A = 0.005745C_{FA} - 0.1862$  ( $r = 0.9958$ ), 可满足动物实验定量分析的要求。

**2.4 检测限** 检测限测定结果表明 FA 血清浓度为  $25 \mu g \cdot L^{-1}$  的标准液的色谱图符合  $S/N = 3$  的条件, 故确定本法的检测限为  $25 \mu g \cdot L^{-1}$ 。

**2.5 回收率与精密度** FA 血清浓度  $334.00$ 、 $458.67$ 、 $1376.00 \mu g \cdot L^{-1}$  的犬血清样品预处理后, 测得三种浓度样品的回收率分别为  $(99.19 \pm 2.59)\%$ 、 $(102.56 \pm 2.09)\%$ 、 $(101.62 \pm 1.74)\%$ 。测得这三种浓度样品的日内平均标准偏差 RSD (%) 分别为  $1.84\%$ 、 $19.1\%$ 、 $1.58\%$ ; 日间差 RSD (%) 分别为  $2.59\%$ 、 $2.10\%$ 、 $1.72\%$ 。

### 2.6 犬一次灌胃芍药制剂 FA 的药代动力学结果

犬一次灌胃川芎: 赤芍 1: 2 和 2: 1 芍药制剂后阿魏酸的体内药代动力学过程均符合开放性一室模型, 两组主要药代动力学参数见表 1。

表 1 犬灌胃川芎: 赤芍 1: 2 组及 2: 1 组阿魏酸的药代动力学参数 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

药动学参数	川芎: 赤芍 1: 2 组	川芎: 赤芍 2: 1 组
$K_a$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$0.111 \pm 0.035$	$0.075 \pm 0.020^{1)}$
$K_e$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$0.013 \pm 0.004$	$0.016 \pm 0.002$
$t_{1/2K_a}$ (min)	$6.701 \pm 1.926$	$9.735 \pm 2.377^{1)}$
$t_{1/2K_e}$ (min)	$61.306 \pm 23.531$	$44.254 \pm 5.518$
$t_{\text{peak}}$ (min)	$24.915 \pm 5.307$	$29.339 \pm 4.101$
$c_{\text{max}}$ ( $\mu g \cdot L^{-1}$ )	$557.797 \pm 172.903$	$1509.518 \pm 275.813^{2)}$
$AUC_{0-\infty}$ ( $\mu g \cdot L^{-1} \cdot \text{min}$ )	$29091.052 \pm 8767.266$	$88261.547 \pm 12530.412^{2)}$
$c_{\text{max}}/AUC$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$0.020 \pm 0.005$	$0.017 \pm 0.003$

注: 两组间比较,  $^{1)} P < 0.01$ ;  $^{2)} P < 0.001$ 。

## 3 讨论

本文采用的 HPLC 内标法定量测定犬灌胃芍药制剂后阿魏酸血清浓度的方法是在参阅多篇文献<sup>[1-6]</sup>经反复摸索确定下来的。根据文献, 曾试用甲醇、乙醚、乙酸乙酯等作为提取剂, 发现提取后杂峰多, 很难实现基线分离; 并且提取、富集耗时长且难以完全避光, 由于阿魏酸见光极易分解, 故效果不理想。本法预处理采用 10% 三氯乙酸沉淀蛋白, 回收率高, 耗时很短, 处理过程易于避光, 不需富集, 直接进样即可, 具有专一性强、准确性、灵敏度高、操作简便快速、所用血清量少的优点, 为今后复方中阿魏酸的血清药物浓度分析提供了有参考意义的方法。

本文研究结果表明犬灌胃川芎: 赤芍 1: 2 和 2: 1

芍药制剂后阿魏酸的体内过程均符合一室开放模型,生物半衰期为  $61.306 \pm 23.531$ (min) 和  $44.254 \pm 5.518$ (min),与文献<sup>[2-4,7]</sup>所报道的兔、大鼠给予阿魏酸单体、川芎及复方煎剂的生物半衰期较接近,表明其在动物体内清除较迅速。其半吸收期  $t_{1/2Ka}$  为  $6.701 \pm 1.926$ (min) 和  $9.735 \pm 2.377$ (min),达峰时间  $t_{peak}$  为  $24.915 \pm 5.307$ (min) 和  $29.339 \pm 4.101$ (min),表明阿魏酸吸收速度极快,血药浓度迅速达到峰值。

中药复方中各药味的不同配伍比例对复方中某种成分的药代动力学参数的影响如何,一直是中药复方药代动力学的基本命题之一。目前已有一些研究文献对中药配伍对复方中某种成分的药代动力学参数的影响进行了初步探索,如常明向等<sup>[2]</sup>报道与当归单煎液比较,当归配伍白芍煎液能够显著减小煎液中阿魏酸的  $Ka$ 、显著延长  $t_{1/2Ka}$ ;黄熙、张琰等<sup>[8,9]</sup>报道与川芎单煎液比较,川芎配伍丹参、川芎+白芍+当归+熟地配伍均导致复方中川芎嗪的吸收速度显著减慢、生物利用度显著降低。本文中,与川芎赤芍 2:1 组相比,川芎赤芍 1:2 组的  $t_{1/2Ka}$  显著缩短,  $Ka$  增大,差异均有显著统计学意义 ( $P < 0.05$ ),表明增加赤芍的配伍比例可导致阿魏酸吸收显著加速;并且川芎赤芍 1:2 组阿魏酸血药峰浓度和 AUC 大致仅是川芎赤芍 2:1 组的 1/3,提示增加赤芍的配伍比例可能减低阿魏酸的生物利用度,表明川芎赤芍的不同配伍比例能够显著影响阿魏酸的药代动力学参数,提示中药复方各药味配伍比例的差异有时会导致某一种成分药代动力学特征的显著变

化。

#### 参考文献:

- [1] 燕福生,刘晓东,宋学英. 高效液相色谱测定血样中阿魏酸含量[J]. 首都医学院学报, 1991, 12(1): 27-29.
- [2] 常明向,徐莲英,陶建生. 当归及其配伍药对当归芍药的药动力学研究[J]. 中药药理与临床, 1992, 8(4): 34-36.
- [3] 常明向,徐莲英,陶建生. 川芎中阿魏酸兔体内药代动力学研究[J]. 中国药学杂志, 1996, 31(1): 43.
- [4] 常明向,徐莲英,陶建生,等. 大鼠体内阿魏酸的代谢及药代动力学研究[J]. 中国中药杂志, 1993, 18(5): 300-302.
- [5] 文爱东,宋岭,黄熙. 阿魏酸在脾虚血瘀证大鼠体内的药代动力学[J]. 第四军医大学学报, 1995, 16(2): 140-141.
- [6] 尚刚伟,黄熙,蒋永培. 正常人口服川芎单煎汤剂后体内阿魏酸的药代动力学研究[J]. 中药药理临床, 1996, 12(6): 38-40.
- [7] 任延军,阙宁宁. 荧光光谱法测定阿魏酸在兔体内的血药浓度及药代动力学研究[J]. 中国医院药学杂志, 1992, 12(11): 488-490.
- [8] 黄熙,夏天,任平,等. 川芎伍用煎剂对川芎嗪药物动力学的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1994, 14(5): 288-291.
- [9] 张琰,宋国增,张忠惠. 川芎煎剂、川芎丹参煎剂与四物汤在大鼠体内川芎嗪的血药浓度测定[J]. 中医研究, 1994, 7(4): 20-21.