

气质联用法测定莪术油多效应成分及其在大鼠体内的整合药动学研究[△]

郭明鑫*, 马德翊, 李文静, 洪博[#](齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

中图分类号 R284.1;R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)20-2752-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.20.04

摘要 目的:建立测定大鼠血浆中莪术油多效应成分质量浓度的方法,并进行整合药动学研究。方法:16只大鼠单次灌胃莪术油提取液1.0 g/kg(按生药量计),分别于给药后0、0.17、0.5、1、2、2.5、3、4、6、8、10、12、24 h自眼眶取血300~400 μ L,采用气质联用法测定大鼠血浆中 α -蒎烯、1,8-桉叶油素、龙脑、 β -榄香烯、莪术醇、吉马酮、莪术二酮的质量浓度。色谱柱为DB-5毛细管柱,载气为氦气,进样口温度为270 $^{\circ}$ C,柱温采用程序升温,流速为1.2 mL/min,分流比为20:1,进样量为1 μ L;离子源为电喷雾离子源,以选择反应监测模式进行正离子扫描,扫描范围为 m/z 20~500。采用DAS 2.0软件计算上述各效应成分的药动学参数,并以其 $AUC_{0-\infty}$ 在 $AUC_{0-\infty}$ 总和中所占的比例自定义权重系数,估算莪术油多效应成分在大鼠体内的整合药动学参数。结果: α -蒎烯、1,8-桉叶油素、龙脑、 β -榄香烯、莪术醇、吉马酮、莪术二酮血药浓度的线性范围分别为2.71~173.54、7.76~496.88、3.37~215.72、21.68~1 387.50、40.21~2 573.44、24.84~3 179.69、47.78~3 057.81 ng/mL($r>0.99$),定量下限分别为2.71、7.76、3.37、21.68、40.21、24.84、47.78 ng/mL,精密度、准确度、基质效应等均符合生物样品定量分析的相关要求。 α -蒎烯、1,8-桉叶油素、龙脑、 β -榄香烯、莪术醇、吉马酮、莪术二酮的 c_{max} 分别为(34.72 \pm 9.97)、(99.86 \pm 5.54)、(16.10 \pm 3.37)、(248.98 \pm 86.19)、(673.75 \pm 104.15)、(2 353.64 \pm 637.83)、(2 420.04 \pm 708.51)ng/mL; t_{max} 分别为(2.33 \pm 0.29)、(0.67 \pm 0.29)、(1.33 \pm 0.58)、(1.83 \pm 0.76)、(0.83 \pm 0.29)、(0.89 \pm 0.18)、(1.17 \pm 0.76)h; $t_{1/2}$ 分别为(8.64 \pm 1.46)、(8.98 \pm 1.63)、(12.43 \pm 2.88)、(19.86 \pm 4.05)、(15.63 \pm 5.50)、(14.17 \pm 4.13)、(7.14 \pm 0.67)h; AUC_{0-t} 分别为(189.78 \pm 89.10)、(454.74 \pm 82.43)、(100.55 \pm 8.27)、(1 067.37 \pm 216.55)、(3 154.16 \pm 405.94)、(16 501.24 \pm 663.88)、(12 524.92 \pm 3 222.10)ng \cdot h/mL; $AUC_{0-\infty}$ 分别为(229.57 \pm 93.50)、(524.32 \pm 81.67)、(46.28 \pm 10.74)、(2 092.70 \pm 416.18)、(5 388.65 \pm 661.86)、(28 198.87 \pm 4 102.62)、(14 139.35 \pm 3 109.10)ng \cdot h/mL。整合药动学参数 c_{max} 为1 880.94 ng/mL, t_{max} 为0.50 h, $t_{1/2}$ 为11.22 h, AUC_{0-t} 为13 050.89 ng \cdot h/mL, $AUC_{0-\infty}$ 为19 015.21 ng \cdot h/mL。结论:该方法可用于大鼠血浆中莪术油多效应成分血药浓度的检测;整合后的莪术油药动学参数与单一效应成分的差异较大,可为表征其整体药动学特征提供参考。

关键词 气质联用法;中药;莪术油;效应成分;整合药动学

Multiple Effective Components Determination in Essential Oil from *Curcuma phaeocaulis* by GC-MS and Its Integrated Pharmacokinetic Study in Rats

GUO Mingxin, MA Deyi, LI Wenjing, HONG Bo (School of Pharmacy, Qiqihar Medical College, Heilongjiang Qiqihar 161006, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To develop the determination method for plasma concentration of effective components in essential oil from *Curcuma phaeocaulis*, and to study its integrated pharmacokinetics. **METHODS:** Sixteen rats were given the extract of essential oil from *C. phaeocaulis* 1.0 g/kg (by crude drug) intragastrically; blood samples 300-400 μ L from orbit were collected 0, 0.17, 0.5, 1, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h after medication. The plasma concentration of α -pinene, 1,8-cineole, borneol, β -elemene, curcumol, germacrone and curdione in rats were determined by GC-MS. The determination was performed on DB-5 capillary column, using helium as carrier gas, at the flow rate of 1.2 mL/min. The injector temperature was 270 $^{\circ}$ C, by temperature programming, and split ratio was 20:1. The sample size was 1 μ L. The ion source was electrospray ion source. The selective reaction monitoring mode was used for the positive ion scanning in the range of m/z 20-500. Pharmacokinetic parameters of above effective components were calculated by using DAS 2.0 software. The weight coefficients were customized according to the

[△] 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(No.81403173);黑龙江省教育科学“十三五”规划重点课题(No.GBB1318139);黑龙江省教育厅大学生创新创业训练计划项目(No.201611230027);黑龙江省留学回国人员择优资助项目(No.2017490);齐齐哈尔医学院内科研基金项目(No.QY2016M-11)

* 硕士研究生。研究方向:体内药物分析。电话:0452-2663159。E-mail:guomx1993@gmail.com

[#] 通信作者:副教授,博士。研究方向:中药药动学。电话:0452-2663159。E-mail:bohong200630174@163.com

proportion of $AUC_{0-\infty}$ in the sum of $AUC_{0-\infty}$. The integrated pharmacokinetic parameters of multiple effective components in essential oil from *C. phaeocaulis* were calculated. **RESULTS:** The linear range of α -pinene, 1,8-cineole, borneol, β -elemene, curcumol, germacrone, and curdione were 2.71-173.54, 7.76-496.88, 3.37-215.72, 21.68-1 387.50, 40.21-2 573.44, 24.84-3 179.69, 47.78-3 057.81 ng/mL, respectively ($r>0.99$). The lower limits of quantitation were 2.71, 7.76,

3.37, 21.68, 40.21, 24.84, 47.78 ng/mL, respectively. The precision, accuracy and matrix effects were in line with related requirements of quantitative analysis of biological samples. The pharmacokinetic parameters of α -pinene, 1, 8-cineole, borneol, β -elemene, curcuminol, germacrone, and curdione were as follows that c_{\max} were (34.72 \pm 9.97), (99.86 \pm 5.54), (16.10 \pm 3.37), (248.98 \pm 86.19), (673.75 \pm 104.15), (2 353.64 \pm 637.83), (2 420.04 \pm 708.51) ng/mL; t_{\max} were (2.33 \pm 0.29), (0.67 \pm 0.29), (1.33 \pm 0.58), (1.83 \pm 0.76), (0.83 \pm 0.29), (0.89 \pm 0.18), (1.17 \pm 0.76) h; $t_{1/2}$ were (8.64 \pm 1.46), (8.98 \pm 1.63), (12.43 \pm 2.88), (19.86 \pm 4.05), (15.63 \pm 5.50), (14.17 \pm 4.13), (7.14 \pm 0.67) h; AUC_{0-t} were (189.78 \pm 89.10), (454.74 \pm 82.43), (100.55 \pm 8.27), (1 067.37 \pm 216.55), (3 154.16 \pm 405.94), (16 501.24 \pm 663.88), (12 524.92 \pm 3 222.10) ng \cdot h/mL; $AUC_{0-\infty}$ were (229.57 \pm 93.50), (524.32 \pm 81.67), (146.28 \pm 10.74), (2 092.70 \pm 416.18), (5 388.65 \pm 661.86), (28 198.87 \pm 4 102.62), (14 139.35 \pm 3 109.19) ng \cdot h/mL, respectively. After integration, the pharmacokinetic parameters were as follows that c_{\max} was 1 880.94 ng/mL; t_{\max} was 0.50 h; $t_{1/2}$ was 11.22 h; AUC_{0-t} was 13 050.89 ng \cdot h/mL; $AUC_{0-\infty}$ was 19 015.21 ng \cdot h/mL.

CONCLUSIONS: The method can be used for the detection of plasma concentration of effective components in rats; pharmacokinetic parameters of essential oil from *C. phaeocaulis* after integration are greatly different from single effective component, which can provide reference for characterization of its overall pharmacokinetics.

KEYWORDS GC-MS; Traditional Chinese medicine; *Curcuma phaeocaulis*; Effective component; Integrated pharmacokinetics

中药药动学的研究由于受到提取及分析技术等因素的影响,常以某单一或简单的几个主要成分为对象。这种方式通常无法准确反映中药多组分整体作用的体内过程,用以阐明中药及其方剂的体内药动学特征具有很大的局限性^[1-3]。因此,如何全面地反映中药有效部位或方剂在机体内的整体药动学特征、建立符合中医药自身规律及特点的药动学研究方法,是中药现代化研究亟需解决的关键问题之一^[4]。

莪术为姜科姜黄属植物蓬莪术(*Curcuma phaeocaulis* Val.)、广西莪术(*C. kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang)和温郁金(*C. wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling)的干燥根茎,主产于广西、四川、浙江等地。相关研究显示,莪术中主要含有挥发油(即莪术油,1%~2.5%)和姜黄素两大类成分^[5]。莪术油的化学成分以单萜和倍半萜类化合物为主,具有抗炎、调节血脂、抗氧化等药理作用^[6-8]。其中,吉马酮和莪术二酮具有明显的抗肿瘤活性^[9],莪术醇具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌等作用^[10],是莪术油中的主要效应成分。近年来,对莪术油的研究多集中在其化学成分及药理作用上,且药动学研究也多局限于莪术醇、吉马酮、莪术二酮等几个单体成分上,尚无莪术油整体药动学行为研究的相关报道。为此,本研究以莪术油为对象,在鉴定及分析其主要效应成分及其药动学特征的基础上^[11-12],对莪术油多效应成分在大鼠体内的整合药动学进行探讨,以期为莪术油的药效物质基础及作用机制研究提供依据。

1 材料

1.1 仪器

7890型气质联用(GC-MS)仪,配有7693型自动进样器和5977A型检测器(美国Agilent公司);TGL16M型低温高速离心机(湖南迈达仪器有限公司);XH-D型涡旋混合器(上海利闻科学仪器有限公司);KQ-200KDB型高功率数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

莪术药材(批号:20121005)购自广西健生堂中药材有限公司,经齐齐哈尔医学院药学院郭丽娜教授鉴定为姜科姜黄素植物蓬莪术(*C. phaeocaulis* Val.)的干燥根茎。

α -萘烯对照品(批号:101561026,纯度:98%)、1,8-桉叶油素对照品(批号:12-2006,纯度:99%)、龙脑对照品(批号:03-2008,纯度:98%)、吉马酮对照品(批号:111665-201204,纯度:99.8%)、莪术二酮对照品(批号:111800-201001,纯度:99.2%)均购自上海博顿生物化工有限公司; β -榄香烯对照品(批号:100268-200401,纯度:99%)、莪术醇对照品(批号:100185-200506,纯度:99%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 动物

清洁II级Wistar大鼠16只,雌雄各半,2月龄,体重(250 \pm 20)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[使用合格证号:SCXK(京)2007-0001]。实验前禁食12 h。动物实验研究方案符合齐齐哈尔医学院实验动物伦理委员会标准(批文号:201714)。

2 方法与结果

2.1 莪术油提取液制备

取干燥莪术药材12.5 g,使用挥发油提取器以500 mL水提取4 h,收集挥发油;将水提液滤过后,浓缩至100 mL。取所得挥发油1 mL,与聚山梨酯80 0.5 mL、浓缩的水提液100 mL混合,得质量浓度为0.125 g/mL(以生药量计)的莪术油提取液。

2.2 给药与样品采集

所有大鼠禁食12 h后,均单次灌胃“2.1”项下莪术油提取液1.0 g/kg[按生药量计,以水为溶剂。由“2.1”项可知,莪术油提取液质量浓度为0.125 g/mL,每只大鼠灌胃2 mL,按照《中药药理实验方法学》(第3版)^[13]中人与大鼠的换算系数0.018计算,最终确定给药剂量为1.0 g/kg]。于给药后0、0.17、0.5、1、2、2.5、3、4、6、8、10、

12、24 h自眼眶取血300~400 μL ,置于含肝素的1.5 mL EP管中,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下以转速10 000 r/min离心10 min,取上层血浆,备用。

2.3 色谱与质谱条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱:DB-5毛细管柱(30 m \times 0.25 mm,0.25 μm);载气:氦气(纯度为99.99%);进样口和检测器温度分别为270 $^{\circ}\text{C}$ 和280 $^{\circ}\text{C}$;流速:1.2 mL/min;分流比:20:1;进样量:1 μL 。柱温采用程序升温(50 $^{\circ}\text{C}$ 维持1 min;以5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升至120 $^{\circ}\text{C}$,并维持1 min;以5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升至150 $^{\circ}\text{C}$,并维持5 min;以3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升至200 $^{\circ}\text{C}$,并维持1 min);总分离时间:33 min;溶剂延迟时间:10 min。

2.3.2 质谱条件 离子源:电喷雾离子源;干燥气:氮气(纯度为99.99%);流速:1.2 mL/min;裂解器电压:70 eV;以选择反应监测(SRM)模式扫描,正离子方式检测,扫描范围: m/z 20~500。各待测物的特征离子—— α -蒎烯: m/z 137、122、106、94、78,1,8-桉叶油素: m/z 155、140、109、82、44,龙脑: m/z 155、140、122、111、96, β -榄香烯: m/z 205、148、108、94、82,莪术醇: m/z 237、136、122、108、94,吉马酮: m/z 219、176、136、108、92,莪术二酮: m/z 237、181、168、110、70。

2.4 混合对照品溶液的制备

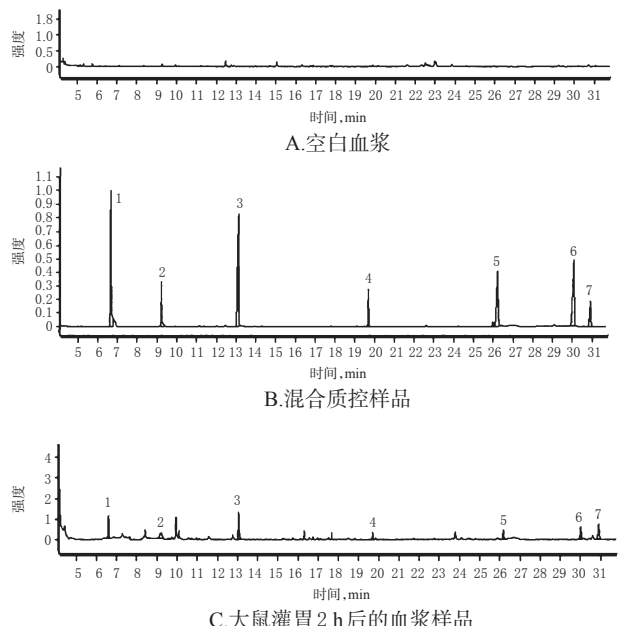
精密称取“1.2”项下待测物对照品各适量,分置于不同的棕色量瓶中,加入甲醇,超声(功率:250 W,频率:40 kHz)溶解,得 α -蒎烯、1,8-桉叶油素、龙脑、 β -榄香烯、莪术醇、吉马酮、莪术二酮质量浓度分别为17.77、3.18、22.09、2.22、16.47、20.35、19.57 mg/mL的贮备液;采用逐级稀释法以甲醇为溶剂进一步将上述贮备液稀释,得质量浓度分别为8 676.7、24 843.84、10 786.69、375、128 672、158 984、305 781 ng/mL的母液;取上述母液各1 mL至同一10 mL量瓶中,用甲醇稀释并定容,混匀,得各待测物质量浓度分别为867.7、2 484.4、1 078.6、6 937.5、12 867.2、15 898.4、30 578.1 ng/mL的混合对照品溶液,备用。

2.5 血浆样品的处理

取血浆样品100 μL 至1.5 mL EP管中,加入正己烷-乙酸乙酯混合溶液(1:1, V/V,下同)100 μL ,涡旋1 min后,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下以转速12 000 r/min离心10 min,将上清液转移至1.5 mL进样瓶中,备测。

2.6 方法学考察

2.6.1 专属性 取空白血浆、混合质控样品(高质量浓度)以及大鼠灌胃2 h后的血浆样品,按照“2.5”项下方法处理后,进样分析,记录色谱图(见图1)。结果, α -蒎烯、1,8-桉叶油素、龙脑、 β -榄香烯、莪术醇、吉马酮、莪术二酮的保留时间分别为6.64、9.23、13.05、19.70、26.18、30.01、30.90 min;各待测物色谱峰峰形良好,血浆中内源性物质不干扰其测定,表明本方法专属性良好。



注:1. α -蒎烯;2.1,8-桉叶油素;3.龙脑;4. β -榄香烯;5.莪术醇;6.吉马酮;7.莪术二酮

Note: 1. α -pinene; 2. 1, 8-cineole; 3. borneol; 4. β -elemene; 5. curcuminol; 6. germacrone; 7. curdione

图1 典型SRM图

Fig 1 Typical SRM chromatograms

2.6.2 标准曲线的绘制与定量下限(LLOQ)的考察 取大鼠空白血浆100 μL ,分别加入各待测物对照品贮备液适量,配制成 α -蒎烯质量浓度分别为2.71、5.42、10.84、21.69、43.38、86.77、173.54 ng/mL,1,8-桉叶油素质量浓度分别为7.76、15.53、31.05、62.11、124.22、248.44、496.88 ng/mL,龙脑质量浓度分别为3.37、6.74、13.48、26.96、53.93、107.86、215.72 ng/mL, β -榄香烯质量浓度分别为21.68、43.36、86.72、173.44、346.88、693.75、1 387.50 ng/mL,莪术醇质量浓度分别为40.21、80.42、160.84、321.68、643.36、1 286.72、2 573.44 ng/mL,吉马酮质量浓度分别为24.84、49.68、99.36、198.73、397.46、794.92、1 589.84、3 179.69 ng/mL,莪术二酮质量浓度分别为47.78、95.56、191.11、382.23、764.45、1 528.91、3 057.81 ng/mL的系列血浆样品,按“2.5”项下方法处理后,进样分析,记录色谱图。以各待测物的峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x,ng/mL)为横坐标进行线性回归。结果,各成分血药浓度在其线性范围内与峰面积的线性关系良好($r > 0.99$),LLOQ分别为2.71、7.76、3.37、21.68、40.21、24.84、47.78 ng/mL,符合生物样品定量分析的相关要求^[11],详见表1。

2.6.3 精密度与准确度试验 取大鼠空白血浆100 μL ,依次加入“2.4”项下各待测物母液适量,得 α -蒎烯低、中、高质量浓度(5.42、21.69、86.77 ng/mL,下同),1,8-桉叶油素低、中、高质量浓度(15.53、62.11、248.44 ng/mL,下同),龙脑低、中、高质量浓度(6.74、26.96、107.86 ng/mL,下同), β -榄香烯低、中、高质量浓度(43.36、173.44、

表1 各待测物的回归方程、*r*、线性范围及LLOQ

Tab 1 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges and LLOQs of the analytes

待测物	回归方程	<i>r</i>	线性范围,ng/mL	LLOQ,ng/mL
α-蒎烯	y=7×10 ³ x+531	0.999 4	2.71~173.54	2.71
1,8-桉叶油素	y=1×10 ³ x-7 477	0.997 1	7.76~496.88	7.76
龙脑	y=8×10 ³ x-852	0.999 9	3.37~215.72	3.37
β-榄香烯	y=1×10 ³ x+496	0.999 3	21.68~1 387.50	21.68
莪术醇	y=5×10 ³ x-681	0.999 8	40.21~2 573.44	40.21
吉马酮	y=5×10 ³ x+7 502	0.999 2	24.84~3 179.69	24.84
莪术二酮	y=2×10 ³ x+403	0.999 7	47.78~3 057.81	47.78

693.75 ng/mL,下同),莪术醇低、中、高质量浓度(80.42、321.68、1 286.72 ng/mL,下同),吉马酮低、中、高质量浓度(49.68、198.73、1 589.84 ng/mL,下同),莪术二酮低、中、高质量浓度(95.56、382.23、1 528.91 ng/mL,下同)的混合质控样品,每个质量浓度平行配制6份,按“2.5”项下方法处理后,进样分析,考察日内精密性;连续测定3 d,考察日间精密性;以实测值与理论值的比值(即方法回收率)考察准确度。结果,各混合质控样品日内、日间RSD<10%,方法回收率较高,符合生物样品定量分析的相关要求^[14],详见表2。

表2 精密性与准确度试验结果

Tab 2 Results of precision and accuracy tests

待测物	精密性			方法回收率 ($\bar{x} \pm s$), % (n=6)	待测物	准确度			方法回收率 ($\bar{x} \pm s$), % (n=6)
	理论质量浓度, ng/mL	日内RSD, % (n=6)	日间RSD, % (n=18)			理论质量浓度, ng/mL	日内RSD, % (n=6)	日间RSD, % (n=18)	
α-蒎烯	5.42	7.7	6.8	99.2±8.3	莪术醇	80.42	5.2	5.9	99.4±11.4
	21.69	9.1	6.9	98.9±6.5		321.68	8.3	4.5	98.3±9.3
	86.77	8.3	5.7	100.8±4.6		1 286.72	5.6	2.5	96.4±3.2
1,8-桉叶油素	15.53	5.2	8.6	97.6±7.5	吉马酮	49.68	6.5	7.2	99.6±8.9
	62.11	4.4	4.8	99.5±5.1		198.73	7.0	5.8	105.2±7.4
	248.44	4.7	9.0	98.5±4.4		1 589.84	2.2	5.9	99.9±8.1
龙脑	6.74	8.9	6.5	97.3±11.3	莪术二酮	95.56	7.8	3.0	98.5±9.4
	26.96	7.0	9.0	99.4±8.9		382.23	8.0	4.1	102.2±7.3
	107.86	2.0	8.8	98.3±3.6		1 528.91	2.0	3.2	99.3±2.9
β-榄香烯	43.36	5.0	9.6	98.9±10.4					
	173.44	5.8	2.3	99.4±8.9					
	693.75	5.4	2.5	98.5±6.5					

2.6.4 基质效应与提取回收率试验 按“2.6.3”项下方法分别配制7个待测物低、中、高质量浓度的混合质控样品各6份,按“2.5”项下方法处理后,进样分析,得色谱峰峰面积(A₁)。按“2.5”项下方法处理空白血浆后,加入各待测物对照品贮备液各适量,使最终质量浓度与混合质控样品对应,进样分析,得色谱峰峰面积(A₂)。取混合

对照品溶液适量,以正己烷-乙酸乙酯混合溶液稀释,使最终质量浓度与混合质控样品对应,进样分析,得色谱峰峰面积(A₃)。基质效应=A₂/A₃×100%,提取回收率=A₁/A₃×100%。结果,基质效应、提取回收率均符合生物样品定量分析的相关要求^[14],详见表3。

2.6.5 稳定性试验 按“2.6.3”项下方法分别配制7个待

表3 基质效应与提取回收率试验结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 3 Results of matrix effect and extraction recovery tests($\bar{x} \pm s, n=6$)

待测物	基质效应			提取回收率, %	待测物	提取回收率		
	理论质量浓度,ng/mL	基质效应, %	提取回收率, %			理论质量浓度,ng/mL	基质效应, %	提取回收率, %
α-蒎烯	5.42	106.2±2.1	68.3±5.3	莪术醇	80.42	100.4±2.1	64.8±3.4	
	21.69	101.1±3.9	79.7±4.9		321.68	102.3±4.2	74.8±4.3	
	86.77	109.2±1.9	80.7±1.5		1 286.72	105.2±2.8	80.5±8.0	
1,8-桉叶油素	15.53	104.3±1.1	69.5±5.1	吉马酮	49.68	104.7±2.8	72.5±6.1	
	62.11	106.2±3.0	77.4±2.6		198.73	106.2±3.1	75.8±3.9	
	248.44	103.4±2.5	79.4±3.5		1 589.84	101.9±2.8	72.9±5.1	
龙脑	6.74	103.7±4.5	69.0±2.5	莪术二酮	95.56	109.2±1.4	69.0±1.9	
	26.96	108.3±2.9	76.0±4.4		382.23	103.3±2.3	78.1±3.1	
	107.86	100.2±1.6	78.8±1.9		1 528.91	102.2±1.6	79.6±4.2	
β-榄香烯	43.36	106.2±2.2	67.7±4.3					
	173.44	101.3±2.3	76.8±3.3					
	693.75	104.3±1.6	80.1±8.9					

测物低、中、高质量浓度的混合质控样品各3份,分别考察其室温放置24 h、反复冻融3次(-20~25℃)的稳定性。结果,各样品实测值的RSD均小于10%(n=3),表明其在上述条件下稳定。

2.7 莪术油整合药动学研究

16只大鼠单次灌胃莪术油提取液1.0 g/kg后,按

“2.2”项下方法采样,按“2.5”项下方法处理后,再按“2.3”项下色谱与质谱条件进样分析,测定莪术油中7个待测物的血药浓度,并绘制平均药-时曲线(见图2A~图2G),使用DAS 2.0软件计算各待测物的药动学参数(见表4)。根据7种待测物的药-时曲线下面积(AUC_{0-∞})在其总AUC_{0-∞}中所占比例自定义各自的权重系数(ω_i),见

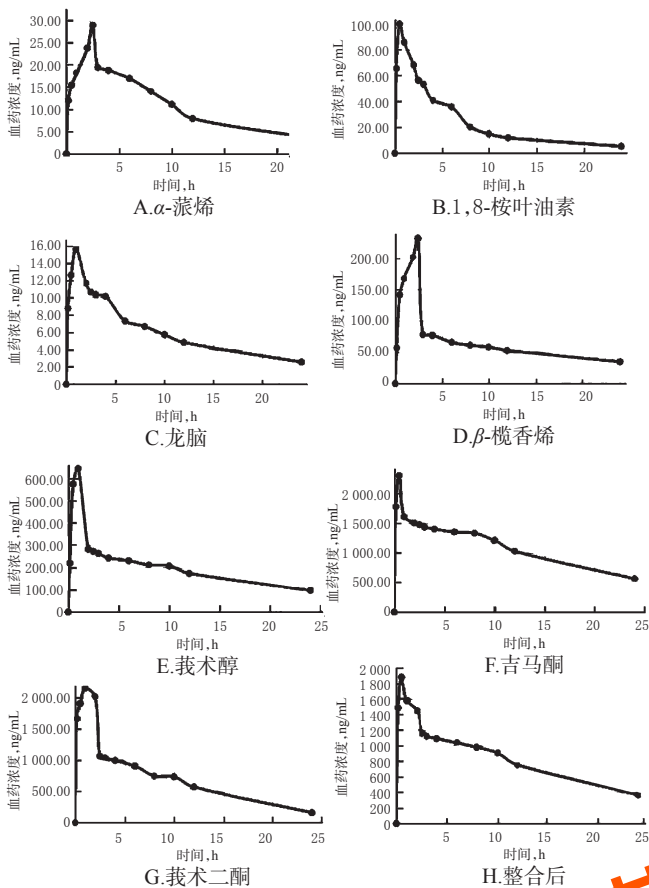


图2 大鼠灌胃后7种莜术油成分的平均药-时曲线及整合后的平均药-时曲线

Fig 2 Mean drug concentration-time curves and integrated drug concentration-time curve of 7 kinds of effective components in essential oil from *C. phaeocaulis* after intragastric administration for rats

表4 大鼠灌胃后7种莜术油成分的药动学参数、 ω_j 及整合后的药动学参数

Tab 4 Pharmacokinetic parameters, ω_j and integrated pharmacokinetic parameters of 7 kinds of effective components in essential oil from *C. phaeocaulis* after intragastric administration for rats

待测物	c_{max} , ng/mL	t_{max} , h	$t_{1/2}$, h	AUC_{0-1} , ng·h/mL	$AUC_{0-\infty}$, ng·h/mL	ω_j
α -蒎烯	34.72 ± 9.97	2.33 ± 0.29	8.64 ± 1.46	189.78 ± 89.10	229.57 ± 93.50	0.004 53
1,8-桉叶油素	99.86 ± 5.54	0.67 ± 0.29	8.98 ± 1.63	454.74 ± 82.43	524.32 ± 81.67	0.010 34
龙脑	16.10 ± 3.37	1.33 ± 0.58	12.43 ± 2.88	100.55 ± 8.27	146.28 ± 10.74	0.002 88
β -榄香烯	248.98 ± 86.19	1.83 ± 0.76	19.86 ± 4.05	1 067.37 ± 216.55	2 092.70 ± 416.18	0.041 26
莜术醇	673.75 ± 104.15	0.83 ± 0.29	15.63 ± 5.50	3 154.16 ± 405.94	5 388.65 ± 661.86	0.106 24
吉马酮	2 353.64 ± 637.83	0.89 ± 0.18	14.17 ± 4.13	16 501.24 ± 663.88	28 198.87 ± 4 102.62	0.555 97
莜术二酮	2 420.04 ± 708.51	1.17 ± 0.76	7.14 ± 0.67	12 524.92 ± 3 222.10	14 139.35 ± 3 109.19	0.278 77
整合后	1 880.94	0.50	11.22	13 050.89	19 015.21	

定了进样口和检测器温度、程序升温等色谱与质谱条件,建立了测定大鼠血浆中莜术油效应成分浓度的GC-MS法。方法学考察结果显示,该方法所得色谱图的峰形良好,各待测物色谱峰均基线分离,且未受血浆内源性物质的干扰,具有灵敏度高、检测速度快的特点,可用于大量生物样品的定量分析;同时,由于灵敏度的提高,本研究对大鼠血样的采集量也有所减少,符合生物

表4)。将各时间点下各待测物的血药浓度赋以对应的权重系数,计算莜术油的整合血药浓度,进一步进行其整合药动学参数的计算^[15]。整合后的平均药-时曲线见图2H,整合后的药动学参数见表4。结果,整合药动学参数与各待测物的药动学参数相比较,差异均较大,提示任何单一成分的药动学行为均不能用于表征莜术油的整体药动学行为。

3 讨论

3.1 整合药动学

现有研究普遍采用的单一成分血药浓度检测及其药动学研究无法体现中药体内代谢的整体性,亦无法阐明单一成分与中药整体的相关性,而中药多组分整合药动学可将中药中的各个主要效应成分的药-时曲线整合为一条能够表征其整体体内代谢特征的药-时曲线,以该方法描述中药的体内过程更为合理且更具优越性^[16]。

3.2 大鼠给药剂量的选择

在急性毒性实验中,研究者多采用灌胃法^[17],此法剂量准确,灌胃的体积一般为1 mL/100 g。本研究根据大鼠的体质量(250 g左右)估算给药体积约为2 mL,再根据体表面积换算系数(0.018)、按成人剂量(9~12 g)换算得大鼠的给药剂量为1.0 g/kg^[13]。

3.3 实验方法的筛选

本课题组曾采用GC法对莜术油中的主要成分进行含量测定,但体外试验结果显示,莜术油成分在肠道内吸收较差,血浆中药物浓度较低,GC法无法对体内药物含量进行准确地定量分析^[18]。因此,需要更加灵敏的检测方法来进行测定。本研究经过多次条件筛选,最终确

样品定量分析的相关要求^[14]。

3.4 结果分析

单一化合物的药动学研究结果显示, α -蒎烯、1,8-桉叶油素、龙脑、 β -榄香烯、莜术醇、吉马酮、莜术二酮在大鼠体内的药动学参数(如 c_{max} 、 t_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 AUC_{0-1} 、 $AUC_{0-\infty}$)差异较大,其中 α -蒎烯与吉马酮、莜术二酮的AUC相差近百倍,提示任何单一成分的药动学行为均很难准确反映莜

术油的整体药动学行为。为此,本研究以各成分 $AUC_{0-\infty}$ 与所有成分 $AUC_{0-\infty}$ 之和的比值为 $\omega_j^{[4]}$, 计算整合药动学参数。结果显示整合前,各单体化合物药动学参数 c_{max} 、 t_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 分别为 $(34.72 \pm 9.97) \sim (2\ 420.04 \pm 708.51)$ ng/mL、 $(0.67 \pm 0.29) \sim (2.33 \pm 0.29)$ h、 $(7.14 \pm 0.67) \sim (19.86 \pm 4.05)$ h、 $(100.55 \pm 8.27) \sim (16\ 501.24 \pm 663.88)$ ng·h/mL、 $(146.28 \pm 10.74) \sim (28\ 198.87 \pm 4\ 102.62)$ ng·h/mL;整合后,莪术油整体药动学参数 c_{max} 、 t_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 分别为 $1\ 880.94$ ng/mL、 0.50 h、 11.22 h、 $13\ 050.89$ ng·h/mL、 $19\ 015.21$ ng·h/mL,与整合前差异较大。整合后的药动学参数充分兼顾了 α -蒎烯、1,8-桉叶油素、龙脑、 β -榄香烯、莪术醇、吉马酮、莪术二酮的特性,且以莪术醇、莪术二酮和吉马酮对其结果的贡献较大(ω_j 较大);同时,整合后的药动学参数更能代表莪术油的整体药动学行为,避免了单一成分对其体内代谢过程的片面阐述^[19]。

综上所述,本研究建立的GC-MS法可用于莪术油多效应成分血药浓度的检测及药动学研究;整合药动学参数可一定程度上更全面地表征莪术油在体内的药动学过程。但本研究所得结果只能用于表征莪术油在大鼠体内的整体药动学特征,考虑到中药药效的多重性与复杂性,仍需对其整合药动学参数与整体药效作用的相关性进行进一步分析。

参考文献

[1] 刘昌孝. 中药药代动力学研究的难点和热点[J]. 药学报, 2005, 40(5): 395-407.

[2] 夏东亚, 郭涛, 潘文灏, 等. HPLC法测定心舒口服液中心舒酸血浆浓度及其在大鼠体内的药动学研究[J]. 中草药, 2004, 35(1): 36-38.

[3] 王雪峰, 刘芳, 王永梅, 等. 小柴胡汤中黄芩苷在大鼠体内的代谢动力学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(2): 84-87, 97.

[4] 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): 377-381.

[5] 李勇, 孙秀燕, 林翠英, 等. 3个品种莪术挥发油化学成分的比较[J]. 中草药, 2005, 36(12): 1785-1787.

[6] 张永为, 李伟平, 蒋福升, 等. 姜黄素结构修饰与生物活

性的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2012, 41(7): 29-31.

[7] 余美荣, 蒋福升, 丁志山. 姜黄素的研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(5): 828-831.

[8] YANG XW, ZHANG P, TAO HY, et al. GC-MS analysis of essential oil constituents from rhizome and root of *Notopterygium forbesii*[J]. *J Chin Pharm Sci*, 2006, 15(4): 200-205.

[9] 杨丰庆, 李绍平, 陈莹, 等. 不同来源莪术中莪术醇、吉马酮、莪术二酮GC-MS定量分析[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(7): 827-832.

[10] 邓嵘, 陈济民, 姚崇舜, 等. 莪术醇的研究进展[J]. 实用药物与临床, 2001, 4(1): 37-39.

[11] 潘瑜, 张园, 向铮, 等. 血浆中莪术醇和吉马酮的测定及其大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中成药, 2013, 35(2): 252-255.

[12] 张蕊, 王本杰, 赵恒利, 等. HPLC-MS/MS法测定血浆中莪术醇浓度及Beagle犬体内的药代动力学研究[J]. 药学报, 2007, 42(9): 973-977.

[13] 陈奇, 邓文龙, 孙瑞元, 等. 中药药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 1167.

[14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 363-368.

[15] DONG LC, ZHANG XH, MA J, et al. The integrated pharmacokinetics of major rhodjaponins correlates with the cardiotoxicity after oral administration of *Rhododendri Mollis* Flos extract in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014. DOI: 10.1016/j.jep.2014.09.021.

[16] 张启云, 徐良辉, 李冰涛, 等. 复方葛根芩连汤多效应成分分类整合药代动力学研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2011, 16(1): 51-56.

[17] 格桑次仁, 余日跃. 藏药四臣方急毒性实验研究[J]. 中国民族医药杂志, 2014, 20(10): 48.

[18] 李文静, 崔涛, 蔡德富, 等. 莪术单煎及三棱合煎后挥发油中有效成分煎出率的比较研究[J]. 中国药房, 2017, 28(22): 3110-3112.

[19] 柴士伟. 中药药代动力学参数拟合的研究进展[J]. 天津药学, 2018, 30(2): 61-65.

(收稿日期: 2018-03-20 修回日期: 2018-08-14)

(编辑: 张元媛)