

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00870

檀香对广枣中原儿茶酸和没食子酸的药代动力学影响

梁杨静, 桑 柏, 申旭霖, 兰 薇, 王世祥, 郑晓晖*

西北大学生命科学学院药物化学, 西安 710069

[摘要] **目的** 建立大鼠体内的没食子酸和原儿茶酸的反相高效液相色谱分析方法, 研究檀香对广枣中没食子酸、原儿茶酸在大鼠体内药代动力学的影响。**方法** 给 SD 大鼠灌服广枣水提液和广枣-檀香水提液, 采用反相高效液相色谱法测定大鼠给药后不同时间血浆中原儿茶酸和没食子酸的浓度, DAS2.0 药动学软件拟合房室模型, 计算药动学参数。**结果** 广枣水提液组没食子酸的主要药动学参数 C_{max} 为 $(0.112 \pm 0.008) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, CL/F $(0.132 \pm 0.016) \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$; T_{max} $(45.0 \pm 0) \text{ min}$, $t_{1/2\beta}$ $(69.3 \pm 0) \text{ min}$; 原儿茶酸的主要药动学参数 C_{max} 为 $(0.550 \pm 0.028) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, T_{max} $(52.0 \pm 0) \text{ min}$, CL/F $(0.078 \pm 0.011) \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$, $t_{1/2\beta}$ $(60.7 \pm 1.1) \text{ min}$ 。广枣-檀香水提液组没食子酸的主要药动学参数 C_{max} 为 $(0.187 \pm 0.010) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, CL/F $(0.094 \pm 0.017) \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$, T_{max} $(30.0 \pm 0) \text{ min}$, $t_{1/2\beta}$ $(69.3 \pm 3.3) \text{ min}$; 原儿茶酸的主要药动学参数 C_{max} 为 $(1.080 \pm 0.066) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, T_{max} $(45.0 \pm 0) \text{ min}$, $T_{1/2\beta}$ $(69.3 \pm 0.2) \text{ min}$, CL/F $(0.011 \pm 0.001) \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。**结论** 广枣-檀香水提液组没食子酸和原儿茶酸的达峰时间提前, 清除率降低, 半衰期延长, 提示檀香可促进广枣中酚酸类物质吸收, 延缓其消除。

[关键词] 药代动力学; 广枣; 檀香; 没食子酸; 原儿茶酸

[中图分类号] R 969.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)08-0870-04

Effects of Sandalwood on pharmacokinetics of gallic acid and protocatechuic acid in *Choerospondiatis* fruit

LIANG Yang-jing, SANG Bai, SHEN Xu-ji, LAN Wei, WANG Shi-xiang, ZHENG Xiao-hui*

The Pharmaceutical Chemistry, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi, China

[Abstract] **Objective** To establish a HPLC method for *in vivo* determination of gallic acid (GA) and protocatechuic acid (PA) in rat plasma, and to study the effect of Sandalwood on the pharmacokinetics of GA and PA. **Methods** SD rats were given the water extracts of *Choerospondiatis* fruit or *Choerospondiatis* fruit and Sandalwood. The pharmacokinetic parameters of GA and PA were calculated by DAS2.0 software at different time points after an oral ration of the above extracts. **Results** The pharmacokinetic parameters after oral administration of *Choerospondiatis* fruit extract were as follows: GA: C_{max} : $(0.112 \pm 0.008) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, CL/F : $(0.132 \pm 0.016) \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$, $t_{1/2\beta}$: $(69.3 \pm 0) \text{ min}$, T_{max} : $(45.0 \pm 0) \text{ min}$; PA: C_{max} : $(0.550 \pm 0.028) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, T_{max} : $(52.0 \pm 0) \text{ min}$, $t_{1/2\beta}$: $(60.7 \pm 1.1) \text{ min}$; CL/F : $(0.078 \pm 0.011) \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$. The pharmacokinetic parameters after oral ration of *Choerospondiatis* fruit-Sandalwood extract were as follows: GA: C_{max} : $(0.187 \pm 0.010) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, CL/F : $(0.094 \pm 0.017) \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$, $t_{1/2\beta}$: $(69.3 \pm 3.3) \text{ min}$, T_{max} : $(30.0 \pm 0) \text{ min}$; PA: C_{max} : $(1.080 \pm 0.066) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, T_{max} : $(45.0 \pm 0) \text{ min}$, $t_{1/2\beta}$: $(69.3 \pm 0.2) \text{ min}$, CL/F : $(0.011 \pm 0.001) \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$. **Conclusion** Oral ration of *Choerospondiatis* fruit-Sandalwood extract results in earlier plasma peaks of PA and GA, lower clearance rate, and longer half life, indicating Sandalwood can promote the absorption of phenolic compounds in *Choerospondiatis* fruit.

[Key words] pharmacokinetics; *Choerospondiatis*; *Santalum album*; galic acid; protocatechuic acid

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(8): 870-873]

广枣为漆树科植物南酸枣的干燥成熟果实, 是蒙医常用药材, 性味甘、酸、平、脂、重、柔, 有行气活血、养心、安神的功效, 用于气滞血瘀、胸痹作痛、心悸气短、心神不安。原儿茶酸 (PA) 和没食子酸

(GA) 是广枣中的水溶性酚酸成分^[1], 具有明显的抗氧化、清除自由基、抑制血小板聚集作用和抗缺氧活性^[2-3], 檀香性味辛温, 具有行气温中、开胃止痛的功效, 对各种血瘀证和冠心病均有较好的治疗作

[收稿日期] 2010-04-02 **[接受日期]** 2010-06-24

[基金项目] 教育部科学研究重点项目(207151), 陕西省中医管理局项目(2007-25-6)。Supported by the Key Project of Chinese Ministry of Education(207151) and Administration of Traditional Chinese Medicine of Shaanxi Province (2007-25-6)。

[作者简介] 梁杨静, 硕士。E-mail: lyj860819@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author)。Tel: 029-88302686, E-mail: zhengxh@nwu.edu.cn

用^[4-5]。本研究组已建立了GA和PA体内的药代动力学研究RP-HPLC方法,并进一步研究了使药冰片对广枣中GA和PA在家兔体内药动学的影响^[6-8]。但檀香对广枣药动学的影响未见报道。

本研究在复方三味檀香散的基础上提出君-使药对“广枣-檀香”,采用RP-HPLC方法观察广枣与檀香合用后,檀香对广枣中PA和GA在大鼠体内的药动学过程的影响,以期为临床安全、合理用药提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂 广枣 *Choerospondias axillaries* (Roxb.) Burt et Hill (产地:湖南,购于陕西省药材公司,由西安交通大学医学院王军宪教授鉴定);檀香 *Santalum album* L. (产地:印度,购于陕西省药材公司,由西安交通大学医学院王军宪教授鉴定);GA对照品(中国药品生物制品检定所,批号:1100831-200302);PA对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110809-200503);肝素钠注射液(河北常山生化药业有限公司,批号:050800);色谱纯甲醇(美国Fisher公司);实验用水为超纯水(自制);其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备 Agilent1100系列高效液相色谱仪,包括在线脱气机、四元梯度泵、自动进样器、柱温箱和二极阵列检测器(美国安捷伦公司);TGL-16G高速离心机(上海安亭科学仪器公司);BF2000氮气吹干仪(北京八方世纪科技有限公司);VERT-TEX26型快速混匀器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Maxima超纯水机(美国基因公司);BP221S电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.3 动物 SD大鼠(由西安交通大学实验动物中心提供,合格证号:陕医动证字2006105),雌雄兼用,体质量200~230g。

1.4 药材提取 取广枣药材粉末(过20~40目筛)100.0g,置于2000ml圆底烧瓶中,加8倍量水,加热回流提取3次,提取时间分别为3.0、3.0、2.0h,抽滤,合并滤液,减压浓缩至100ml,得广枣水提液,GA和PA含量分别为 $0.43\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1.30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,4℃冷藏备用。广枣及檀香药材粉末(过20~40目筛)各100.0g,于3000ml圆底烧瓶中,8倍量水,加热回流提取3次,提取时间分别为3.0、3.0、2.0h,抽滤,合并滤液,减压浓缩至100ml,得广枣-檀香水提液,GA和PA的含量分别为 $0.39\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1.14\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,4℃冷藏备用。

1.5 血浆样品预处理 取健康SD大鼠12只,随机分为2组,每组6只,雌雄兼用,禁食12h,自由饮

水。分别灌服广枣水提液(原药材 $30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)以及广枣-檀香水提液(原药材 $30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),给药后于0、5、15、30、45、60、90、120、150、180、240、360、480、720min眼球取血0.5ml置于肝素化离心管中, $2800\times\text{g}$ 离心10min,分离血浆,于-20℃冻存。

1.6 血药浓度的测定

1.6.1 色谱条件 色谱柱:Agilent TC-C₁₈,5μm,4.6mm×250mm;流动相:甲醇-0.2%甲酸水(6:94,V/V);流速: $0.8\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$;检测波长:270nm;柱温:25℃;进样量:50μl。

1.6.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取GA和PA对照品各1.0mg,置于10.0ml棕色容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,制得浓度为 $0.10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液,4℃冷藏备用。

1.6.3 血浆样品的预处理 取1.5项下血浆0.3ml,加入60μl10%三氯乙酸-水沉淀蛋白,涡旋2min后,加0.9ml醋酸乙酯萃取,涡旋2min, $2800\times\text{g}$ 离心10min,取出上清液,萃取2次。合并醋酸乙酯层,氮气吹干后,加入0.3ml流动相溶解,用0.45μm水微米滤膜过滤,进样。

1.6.4 方法学考察 线性关系及检测限:取大鼠空白血浆0.3ml,加入适量混合对照品溶液,按1.6.3项下空白血浆供试品溶液制备方法制备样品,制得PA浓度分别为3.50、1.75、0.88、0.44、0.22、0.11、0.05、0.03 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和GA浓度分别为2.50、1.25、0.63、0.31、0.16、0.08、0.04、0.02 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列空白血浆加混标供试品溶液。在拟定分析条件下精密吸取50.0μl注入液相色谱仪,记录峰面积。分别以浓度($x,\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)为横坐标,以峰面积(y)为纵坐标,进行回归分析。

精密度和回收率试验:将相同量的混合对照品溶液加入等体积的空白血浆和水中,制成低、中、高3个浓度(GA为0.04、0.16、1.25 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;PA为0.06、0.22、1.75 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,下同)的混标血浆样品和混标水溶液。将混标水溶液在拟定分析条件下进样,记录峰面积,由GA和PA的线性方程计算得到测量值,计算方法回收率。分别按1.6.3项下的样品制备方法制备样品,在拟定分析条件下进样,日内重复测定5次;将上述3个浓度的样品在5d内连续测定5次;分别计算日内、日间精密度和回收率。

冻融稳定性:取空白血浆,分别加入适量GA和PA对照品溶液,得到低、中、高3个浓度的空白血浆加对照品溶液,置于-20℃冷冻,24h后于室温下解冻,按1.6.3项下的方法制备样品。进样50.0μl,在拟定的分析条件下进行检测,测定GA和PA的浓度变化。并将样品重新冷冻24h。按上述步骤重复

6次,考察冻融周期对样品稳定性的影响。

短期稳定性:取空白血浆样品,加入适量 GA 和 PA 对照品溶液,得到低、中、高浓度的空白血浆加对照品溶液,室温下放置 4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、24.0 h,按 1.6.3 项下样品制备方法制备样品。进样 50.0 μl ,在拟定分析条件下进行检测,检测 GA 和 PA 的浓度变化,考察温度对样品稳定性的影响。

长期稳定性:取空白血浆样品,加入适量 GA 和 PA 对照品溶液,得到低、中、高浓度的空白血浆加对照品溶液,置于一20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻,分别贮存 1、2、4、8 周后在室温条件下解冻,按 1.6.3 项下方法制备样品,进样 50.0 μl ,在拟定分析条件下进行检测,检测 GA 和 PA 的浓度变化,考察贮存时间对样品稳定性的影响。

1.7 药动学研究 取 1.6.3 项下样品 50 μl ,在拟定色谱条件下进样分析,按标准曲线计算 GA、PA 的浓度,以时间(t)为横坐标,血药浓度(c)为纵坐标绘制药-时曲线。DAS 2.0 药动学软件处理,拟合房室模型。

2 结果

2.1 方法的选择性 如图 1 所示,GA 和 PA 的峰形良好,保留时间分别为 15.0、28.0 min,空白血浆中杂质以及内源性物质均不干扰酚酸类成分样品峰,基线噪音小。

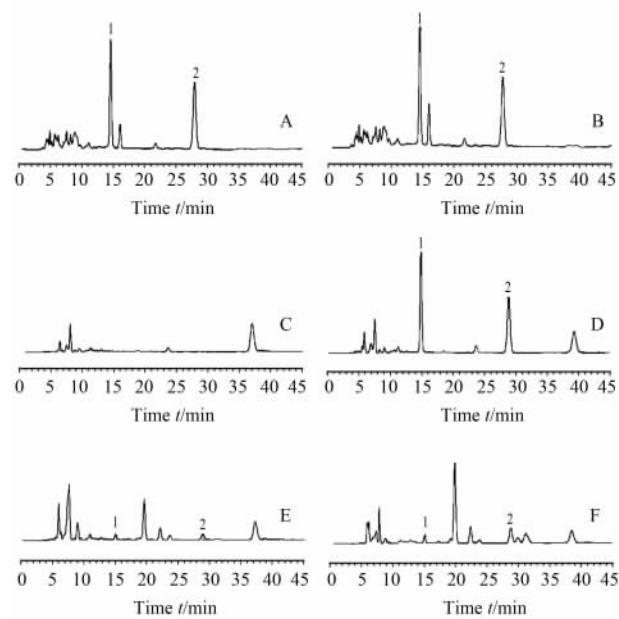


图 1 样品的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC chromatograms

A: *Choerospondiatis* fruit; B: *Choerospondiatis* fruit-Santalwood; C: Blank plasma; D: Blank plasma with addition of standard substances; E: Plasma contained *Choerospondiatis* fruit; F: Plasma contained *Choerospondiatis* fruit-Santalwood

2.2 线性关系及检测限 得 GA 和 PA 回归方程分别为 $y=250.75x+3.1791$ ($r=0.9989, n=8$) 和 $y=149.51x-1.7735$ ($r=0.9996, n=8$)。线性范围分别为 $0.02\sim 2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.03\sim 3.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,检出限($S/N=3$ 计)均为 $0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 精密度和回收率 如表 1 所示,GA 和 PA 的加样回收率均在 85% 以上,日内、日间精密度 RSD 值均小于 7%,表明在所选浓度范围回收率较高,精密度良好。

表 1 原儿茶酸和没食子酸的回收率和精密度

Tab 1 Recovery and precision of gallic acid and protocatechuic acid in plasma

Compd.	Recovery (% , n=6)	Precision, RSD(%)	
		Intra	Inter
Gallic acid			
0.04 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	88.22 \pm 6.32	4.21	6.21
0.16 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	94.52 \pm 4.52	4.35	5.66
1.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	93.94 \pm 3.95	3.38	4.87
Protocatechuic acid			
0.06 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	89.59 \pm 2.53	4.46	5.62
0.22 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	91.92 \pm 4.70	5.51	6.65
1.75 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	91.90 \pm 2.42	3.82	3.99

2.4 稳定性实验

2.4.1 冻融稳定性 在拟定分析条件下,进样 50.0 μl ,测定 GA 3 个浓度的 RSD 分别为 99.8%、101.5%、98.7%,PA 3 个浓度的 RSD 分别为 102.1%、103.3%、99.9%,稳定性良好。

2.4.2 短期稳定性 在拟定分析条件下,进样 50.0 μl ,测定 GA 3 个浓度的 RSD 分别为 103.2%、102.0%、97.7%,PA 3 个浓度的 RSD 分别为 104.6%、102.0%、101.6%,稳定性良好。

2.4.3 长期稳定性 在拟定分析条件下,进样 50.0 μl ,测定 GA 3 个浓度的 RSD 分别为 98.2%、96.6%、95.6%,PA 3 个浓度的 RSD 分别为 96.7%、98.1%、95.2%,稳定性良好。

2.5 药代动力学研究 GA、PA 均呈二室开放模型,药-时曲线见图 2,主要的药代动力学参数见表 2。

3 讨论

在色谱条件优化的过程中,考察了不同比例的甲醇-水及乙腈-水流动相,发现在甲醇-水(含 0.2% 甲酸)6:94 体系时分离效果最佳,基线平稳,主要色谱峰的对称性良好,保留时间适宜。血样处理时,先经 10% 三氯乙酸沉淀蛋白,再用乙酸乙酯萃取 3 次,此方法快速准确,绝对回收率高。因此,该法可用于 PA 和 GA 血药浓度的测定及药动学研究。GA 和 PA 的半衰期和达峰时间与文献报道^[9] 有所不

同,其原因可能是由于中药在体内的作用就是一个综合、复杂的化学体系在机体内协同调节作用的结果,中药进入体内后,药效成分之间可能存在拮抗或者协同作用,从而影响了指标成分在体内的代谢行为,这也佐证了中药的“药辅共生”理论。

实验数据显示,给大鼠灌胃广枣或广枣-檀香后,GA和PA在大鼠体内的药-时曲线均符合二室开放模型。广枣与檀香配伍后,檀香可使PA和GA吸收半衰期 $t_{1/2\alpha}$ 、 $t_{1/2\beta}$ 、 K_a 明显增大,血药浓度 C_{max} 增大,血药浓度曲线下面积AUC增加,清除率CL/F降低,表观分布容积V/F减小,提示檀香可使GA和PA的吸收加快,吸收量增大,排泄减慢,提高了GA及PA的生物利用度。这可能是檀香中的挥发油可以增加广枣中酚酸类成分的跨膜能力,使酚酸类成分吸收加快、吸收量增大的结果。檀香中的挥发油有着与冰片相似的结构特点,冰片可竞争抑制P-糖蛋白药泵作用^[10],提示檀香中的挥发油可能也具有抑制P-糖蛋白药泵作用,从而减慢广枣中酚酸类成分的排泄。

表2 大鼠灌胃广枣、广枣-檀香后的药代动力学参数

Table 2 Main pharmacokinetics parameters of GA and PA

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Parameter	Choerospondiatis fruit		Choerospondiatis fruit-Sandalwood	
	PA	GA	PA	GA
$t_{1/2\alpha}$ t/min	28.5±7.8	24.5±7.1	43.1±0.0*	49.9±2.7**
$t_{1/2\beta}$ t/min	60.7±1.1	69.3±0	69.3±0.2**	69.3±3.3**
V/F(L·kg ⁻¹)	3.75±0.97	16.20±7.31	1.37±0.21**	5.85±1.86**
CL/F(L·min ⁻¹ ·kg ⁻¹)	0.078±0.011	0.132±0.016	0.011±0.001*	0.094±0.017*
AUC _(0-∞) (mg·min·L ⁻¹)	61.7±10.2	20.3±2.7	276.0±2.6	21.0±3.9*
K_{12} (min ⁻¹)	0.006±0.001	0.017±0.032	0.007±0.004	0.006±0.012*
K_{21} (min ⁻¹)	0.015±0.002	0.039±0.024	0.011±0	0.013±0.002
C_{max} ρ _B /(mg·L ⁻¹)	0.550±0.028	0.112±0.008	1.08±0.07	0.187±0.010
T_{max} t/min	52.0±0	45.0±0	45.0±0	30.0±0**
$t_{1/2Ka}$ t/min	14.8±6.4	15.7±8.8	29.0±36.6	21.5±15.6*

Dose of Choerospondiatis fruit: 20 g/kg, dose of Choerospondiatis fruit-Sandalwood: 20 g/kg + 0.6 g/kg. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Choerospondiatis fruit

[参考文献]

- [1] 邓科君,张 艺,王 平,杨足军. 反相高效液相色谱法同时测定藏药广枣中没食子酸和原儿茶酸的含量[J]. 色谱,2006,24:652.
- [2] Cao Y G, Zhang L, Ma C, Chang B B, Chen Y C, Tang Y Q, et al. Metabolism of protocatechuic acid influences fatty acid oxidation in rat heart: new anti-angina mechanism implication [J]. Blochem Pharmacol, 2009, 77: 1096-1104.
- [3] 郭 英,贝玉祥,王雪梅,高云涛. 广枣提取物体外清除活性氧自由基及抗氧化作用研究[J]. 微量元素与健康研究,2008,25:22-24.
- [4] 魏茂春. 活血化痰法异病同治 26 例[J]. 吉林中医药,1997,17:16.
- [5] 郑慧敏. 穴位外敷治疗冠心病 68 例探讨[J]. 浙江中西医结合杂志,1997,7:276.
- [6] 王世祥,兰 薇,骆 凯,卫引茂,郑晓晖,郑建斌. RP-HPLC 法

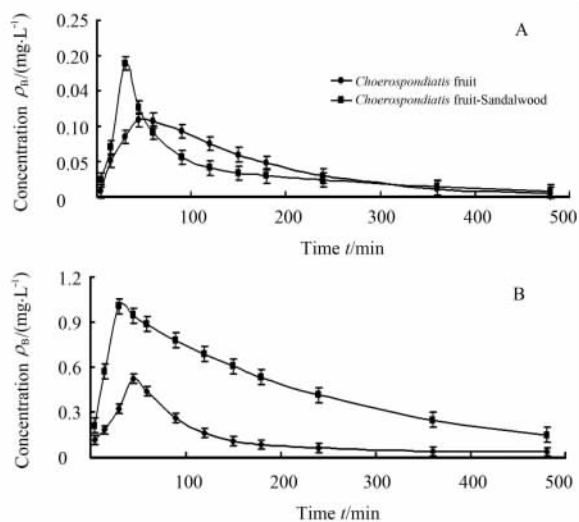


图2 大鼠灌胃广枣、广枣-檀香后 GA(A)和 PA(B)药物浓度-时间曲线

Fig 2 Concentration-time curves of GA(A) and PA(B) in rats after i.g. injection

$n=6, \bar{x} \pm s$

研究广枣在家兔体内的药代动力学[J]. 药物分析杂志,2007, 27:1981-1983.

- [7] 兰 薇,王世祥,房敏峰,骆 凯,杨 洁,郑晓晖. 蒙药广枣中没食子酸在正常和气滞血瘀家兔体内的药代动力学研究[J]. 中国民族医药杂志,2007,6:48-49.
- [8] 杨 洁,王世祥,兰 薇,刘春芝,郑晓晖. 冰片对原儿茶酸在家兔体内药动学的影响[J]. 中国中药杂志,2009,34:1141-1143.
- [9] Shahrzad S, Aoyagi K, Winter A, Koyama A, Bitsch I. Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans [J]. Hum Nutr Metab Res Commun, 2001, 131: 1207-1210.
- [10] 朱国栋. 冰片开放血脑屏障及通过 P 糖蛋白介导的机制研究[D]. 广州医学院优秀硕士论文,2009.

[本文编辑] 尹 茶