

藁本内酯在大鼠肝微粒体中代谢的酶动力学

钱 敏, 石力夫*, 胡晋红

(第二军医大学附属长海医院药学部, 上海 200433)

摘要: 研究体外大鼠肝微粒体藁本内酯代谢的酶动力学及选择性 CYP450 酶抑制剂对其代谢的影响。建立测定肝微粒体孵育液中藁本内酯含量的 LC-MS 法, 以尼群地平为内标, 二者的定量离子 m/z 分别选择 173 和 315。考察确定最佳孵育条件, 进行藁本内酯代谢的酶促反应动力学研究, 通过特异性抑制试验, 探讨参与藁本内酯代谢的主要同工酶。结果显示, 酮康唑、甲氧苄啶、 α -萘黄酮显著抑制藁本内酯的体外代谢, 而奥美拉唑、4-甲基吡唑、奎尼丁对其体外代谢影响不大。可见 CYP3A4、CYP2C9 和 CYP1A2 是参与藁本内酯代谢的主要代谢酶, CYP2C19、CYP2E1 和 CYP2D6 没有明显参与催化其代谢。

关键词: 藁本内酯; 肝微粒体; 酶促反应动力学

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 04-0395-06

Enzyme kinetics of ligustilide metabolism in rat liver microsomes

QIAN Min, SHI Li-fu*, HU Jin-hong

(Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: To study the enzyme kinetics of ligustilide metabolism and the effects of selective CYP450 inhibitors on the metabolism of ligustilide in liver microsomes of rat, a LC-MS method was established for quantitative analysis of ligustilide in liver microsomes incubation system with nitrendipine as internal standard. The determination m/z for ligustilide was 173, and for nitrendipine, 315. An optimum incubation system was found and various selective CYP inhibitors were used to investigate their inhibitory effects on the metabolism of ligustilide. The results showed that enzyme kinetics of ligustilide could be significantly inhibited by ketoconazole, trimethoprim and α -naphthoflavon but scarcely inhibited by omeprazole, 4-methylpyrazole and quinidine. Therefore, CYP3A4, CYP2C9 and CYP1A2 are the major isoenzyme participated in *in vitro* metabolism of ligustilide.

Key words: ligustilide; liver microsomes; enzyme kinetics

藁本内酯 (ligustilide) 是当归、川芎、藁本等药材中挥发油的主要活性成分。现代药理学研究表明, 藁本内酯是钙通道及其受体抑制剂, 从而具有舒张血管的作用^[1,2], 其在保护局部短暂性脑缺血后的脑损伤和神经损害方面也有很明显的疗效^[3-6], 同时还可以通过抑制血管平滑肌细胞的增殖, 治疗和预防动脉粥样硬化^[7], 此外, 还有研究^[8]显示藁本内酯具有良好的改善微循环作用, 可用于防治与微循环障碍有关

的疾病。目前已有对藁本内酯经肝代谢及其代谢产物的报道^[9], 但有关藁本内酯在肝微粒体体外的代谢及肝药酶参与代谢的研究, 国内外尚未见报道。本文旨在研究藁本内酯在大鼠肝微粒体中体外代谢的酶促反应动力学过程及参与代谢的肝药酶, 为联合用药中的药物相互作用和临床安全合理用药提供依据。

材料与方法

仪器 Agilent 6410 三重串联四级杆高效液相色谱联用仪 (美国, Agilent 公司), DY89-II 型电动玻

收稿日期: 2008-09-27.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-81873736, E-mail: shilifu72227@sohu.com

璃匀浆机 (宁波新芝生物科技有限公司), himac CR21 高速低温离心机 (日本, Hitachi 日立公司), himac CS120GXL 微量超速离心机 (日本, Hitachi 日立公司), UV-2201 紫外分光光度计 (日本, 岛津制作所), THZ-C 恒温振荡器 (江苏太仓市实验设备厂)。

试剂与药品 尼群地平 (nitrendipine)、奥美拉唑钠 (omeprazole sodium)、甲氧苄啶 (trimethoprim)、酮康唑 (ketococonazole) 均购自中国药品生物制品检验所, 藁本内酯系实验室自制 (含量>98%), 4-甲基吡唑 (4-methylpyrazole) 购自新沂市一诺生物化工有限公司, α -萘黄酮 (α -NF) (美国 Sigma 公司), 奎尼丁 (quinidine) (美国 Alfa Aesar 公司), 还原型辅酶II (NADPH) (美国 Roche 进口分装), 甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国 Sigma 公司), 其他试剂均为国产分析纯化学试剂。

肝微粒体的制备 Sprague Dawley (SD) 大鼠, 雄性, 体重 (220 ± 20) g。购自第二军医大学实验动物中心, 合格证号: XK (沪) 2007-0003。大鼠禁食不禁水 12 h 后, 脱颈椎处死, 立即剖取完整的肝脏组织, 按文献^[10]方法制成肝微粒体悬液。用 Lowry 法^[10]测定蛋白浓度。

溶液的配制 Tris-HCl 缓冲液: 精密称定 Tris-base 粉末 6.05 g, KCl 粉末 11.10 g, 加入 1.0 % 吐温-80 水溶液 (w/v) 1 L 使之溶解完全, 滴加 6 mol·L⁻¹ HCl, 调至 pH 7.4, 将该 Tris-HCl 缓冲液分装后置冰箱 4 °C 冷藏。

NADPH 再生系统: 精密称取 NADPH 0.025 0 g, 用 Tris-HCl 缓冲液 7.5 mL 溶解完全, 即得 4.0 mmol·L⁻¹ NADPH 再生系统溶液, 该溶液采取临用新鲜配制的方法。

藁本内酯储备液: 精密称取藁本内酯对照品 0.025 0 g, 置 25 mL 量瓶, 加甲醇溶解, 并定容至刻度, 即得藁本内酯储备液 1 mg·mL⁻¹, 作为样品标准溶液母液, 于 4 °C 避光冷藏备用。

温孵条件 取冻存的大鼠肝微粒体悬液, 以新鲜配制的还原型辅酶II (NADPH) 再生系统稀释, 并加入藁本内酯甲醇溶液, 使肝微粒体蛋白浓度为 0.5 g·L⁻¹, NADPH 终浓度为 1 mmol·L⁻¹, 藁本内酯终浓度为 60 μ mol·L⁻¹, 甲醇浓度<1% (v/v)。启动反应, 开始计时。于 37 °C 振荡温孵, 并于温孵液面吹以氧气流。于温孵后不同时间取 200 μ L 该温孵液, 加入等体积冰冷的甲醇终止反应。

样品处理 取肝微粒体温孵液 200 μ L, 加入内标尼群地平甲醇溶液 (1 μ g·mL⁻¹) 10 μ L, 立即涡旋

15 s, 并加入冰冷的甲醇 200 μ L, 终止反应同时沉淀蛋白, 涡旋 1 min, 于 12 000 r·min⁻¹ ($r = 5$ cm) 离心 15 min, 取上清液 5 μ L 进行 LC-MS 测定。

色谱、质谱条件 液相色谱柱为 Agilent SB-C₁₈ (2.1 mm $\times$ 50 mm, 3.5 μ m), 流动相为乙腈-2 mmol·L⁻¹ 乙酸铵水溶液 (70 : 30), 流速为 0.3 mL·min⁻¹, 进样量为 5 μ L, 在室温下进行分析。选用电喷雾离子化方式 (electrospray ionization, ESI), 进行正离子 (positive) 多离子反应监测 (multi-reaction monitoring, MRM), 干燥气 (Gas) 流速为 10 L·min⁻¹, 干燥气温度为 300 °C。藁本内酯母离子为 m/z : 190, 定量离子选择 m/z 173, 碰撞电压 (fragmentor) 优化为 135 V, 碰撞能量 (collision energy) 为 12 eV; 内标尼群地平母离子为 m/z : 361, 定量离子选择 m/z 315, 碰撞电压优化为 100 V, 碰撞能量为 8 eV。

孵育时间对藁本内酯体外代谢的影响 取冻存的大鼠肝微粒体悬液, 解冻后立即取适量, 以 Tris-HCl 缓冲液稀释, 并加入藁本内酯甲醇溶液、NADPH 溶液, 使形成 4.0 mL 的温孵体系, 其中肝微粒体蛋白浓度为 0.5 g·L⁻¹, 药物浓度为 60 μ mol·L⁻¹, NADPH 浓度为 1 mmol·L⁻¹, 甲醇浓度不超过 0.5% (v/v)。加入 NADPH 后即置 37 °C 振荡温孵, 启动反应并开始计时。于温孵 10、20、30、40、50、60、80、100 和 120 min 时, 移取该温孵液 200 μ L, 按“样品处理”项下处理后, 进行 LC-MS 分析测定。结果代入随行的标准曲线计算得到各时间点所剩的底物浓度, 以代谢量对时间做非线性回归曲线, 即得到孵育时间对体外肝微粒体中藁本内酯代谢的影响关系。

肝微粒体蛋白浓度对藁本内酯体外代谢的影响 取冻存的大鼠肝微粒体, 同上处理, 使形成 1.0 mL 的温孵体系, 其中肝微粒体蛋白质量浓度分别为 0.25、0.5、0.75、1.0 和 1.5 g·L⁻¹, 底物藁本内酯浓度为 60 μ mol·L⁻¹, NADPH 含量为 1 mmol·L⁻¹, 甲醇浓度不超过 0.5% (v/v)。加入 NADPH 启动反应后即置 37 °C 振荡温孵, 并开始计时。于温孵 30 min 后, 分别取温孵液 200 μ L, 预处理后, 进行 LC-MS 分析测定。结果代入随行的标准曲线计算得到各温孵液中所剩的底物浓度, 以代谢量对酶浓度做非线性回归曲线, 即得到肝微粒体酶浓度对其中藁本内酯的代谢的影响关系。

底物浓度对藁本内酯体外代谢的影响 取冻存的大鼠肝微粒体, 同上处理, 使形成 1.0 mL 的温孵体系, 其中肝微粒体蛋白质量浓度为 0.5 g·L⁻¹, 底物藁本内酯浓度分别为 20、40、60、80、100、120、

140、160 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, NADPH 浓度为 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 甲醇浓度不超过 0.5% (v/v)。加入 NADPH 启动反应后即置 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡温孵, 并开始计时。于温孵 30 min 后, 分别取温孵液 200 μL , 预处理后, 进行 LC-MS 分析测定。结果代入随行的标准曲线计算得到各底物浓度时所剩的藁本内酯浓度, 以代谢量对底物浓度做非线性曲线, 即得到反应速度对底物浓度的关系曲线。

酶促反应动力学参数的测定 为准确测定酶促反应动力学参数包括最大反应速度 (V_{max})、米氏常数 (K_{m}) 和内在代谢清除率 (CL_{int}), 选择最佳孵育时间与最佳酶浓度, 测定在不同底物浓度下底物被代谢的量。所测得的结果用 Lineweave-Burk 作图法, 即双倒数作图法, 以 $1/V$ 对 $1/[S]$ 作图, 得到一条直线, 其纵轴截距即为 $1/V_{\text{max}}$, 横轴截距即为 $-1/K_{\text{m}}$ 。代谢清除率 CL_{int} 为 $V_{\text{max}}/K_{\text{m}}$ 。

代谢抑制实验 配制温孵体系 2.0 mL, 使其中肝微粒体蛋白质量浓度为 0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, NADPH 含量为 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。先分别加入 CYP 酶选择性抑制剂的甲醇溶液, 其终浓度及抑制的同工酶如下: α -萘黄酮 (1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CYP 1A2)、甲氧苄啶 (2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CYP 2C9)、奥美拉唑 (2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CYP 2C19)、奎尼丁 (1.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CYP 2D6)、4-甲基吡唑 (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CYP 2E1)、酮康唑甲醇溶液 (2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CYP 3A4)。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡温孵 10 min 后, 加入藁本内酯甲醇溶液其终浓度为 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 且甲醇浓度不超过 0.5% (v/v)。开始计时, 继续温孵 10、20、30、40、50 和 60 min 时, 移取各温孵液 200 μL , 预处理后进行 LC-MS 分析测定。结果代入随行的标准曲线计算得到抑制剂抑制后各时间点的底物浓度, 以各自的剩余底物浓度对时间作图, 得到各选择性抑制剂作用下的体外代谢药时曲线。

结果

1 方法学验证

1.1 定量离子选择 藁本内酯和尼群地平 ESI 源离子扫描 (product ion scan) 的质谱图如图 1、2 所示, 藁本内酯的主要碎片为 m/z : 173、161、145、117、105; 尼群地平的主要碎片为 m/z : 329、315、301、283。经过考察优化, 依据定量离子选择原则, 选择 m/z 173、 m/z 315 分别为藁本内酯和尼群地平含量测定的定量离子。

1.2 质谱条件的优化 如图 3、4 所示, 碰撞电压固定为 135 V, 以不同碰撞能量作用于藁本内酯, 当碰

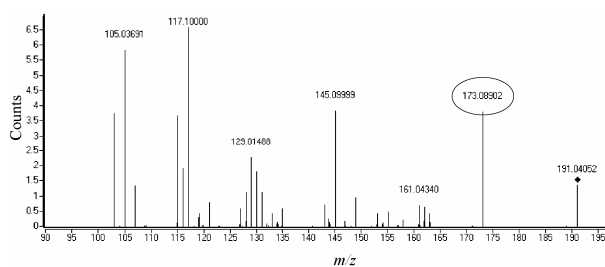


Figure 1 The product ion scan of ligustilide

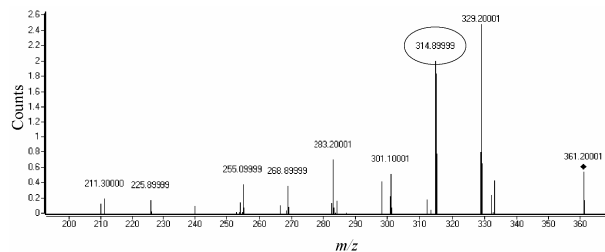


Figure 2 The product ion scan of nitrendipine

撞能量为 12 eV 时, 检测到定量离子最多; 同理固定碰撞能量为 12 eV, 以不同碰撞电压作用于藁本内酯, 得到最佳碰撞电压为 135 V。

如图 5、6 所示, 碰撞电压固定为 100 V, 以不同碰撞能量作用于尼群地平, 当碰撞能量为 8 eV 时, 检测到的定量离子最多; 同理, 固定碰撞能量为 8 eV, 以不同碰撞电压作用于尼群地平, 得到最佳碰撞电压为 100 V。

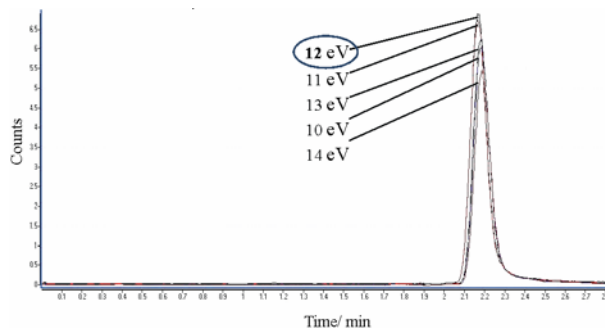


Figure 3 MRM gram of ligustilide split with different collision energy (Fragmentor: 135 V)

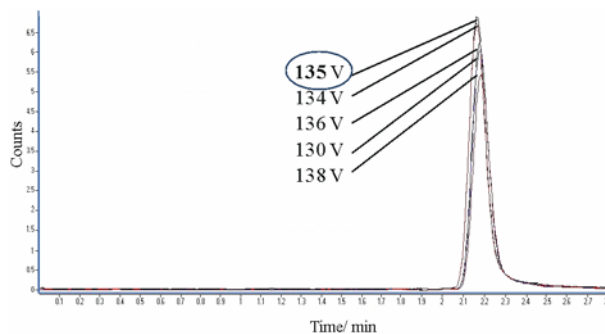


Figure 4 MRM gram of ligustilide split with different fragmentors (CE: 12 eV)

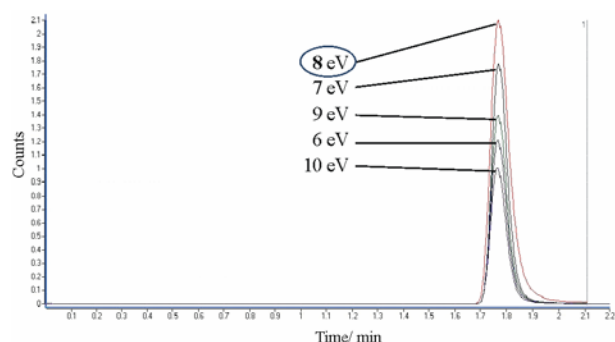


Figure 5 MRM gram of nitrendipine splitted with different collision energy (Fra: 100 V)

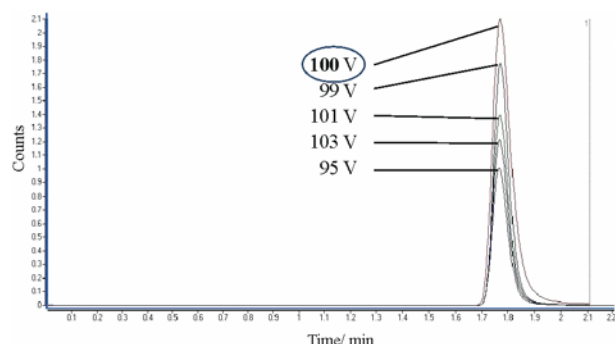


Figure 6 MRM gram of nitrendipine splitted with different fragmentor (CE: 8 eV)

1.3 专属性 分别将灭活的空白肝微粒体稀释液、加入内标和藁本内酯标准液的灭活肝微粒体以及实测肝微粒体温孵样品,按照“样品处理”项下的方法处理后,进行 LC-MS 分析,结果如图 7 所示。比较可见:内标尼群地平与药物藁本内酯的保留时间分别为 1.78 min 和 2.19 min,能够达到完全分离;内源性杂质对内标和藁本内酯的测定没有干扰,方法专属性良好。

1.4 线性与范围 肝微粒体悬液灭活后,以 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4) 稀释至蛋白浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,移取 $200 \text{ } \mu\text{L}$,分别取不同浓度的藁本内酯标准甲醇溶液 $10 \text{ } \mu\text{L}$,涡旋 30 s ,得到终质量浓度为 2 、 4 、 8 、 12 、 16 、 $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 15 、 20 、 25 、 30 、 35 、 $40 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的肝微粒体溶液。分别预处理后,进行 LC-MS 分析测定。将药物与内标的峰面积比对加入的藁本内酯终浓度做线性回归。计算得到回归方程 ① $R = 0.091c - 0.011$ ($r = 0.9999$, $n = 6$) 藁本内酯浓度在 $2 \sim 20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内呈良好线性;回归方程 ② $R = 0.095c - 0.095$ ($r = 0.9998$, $n = 6$) 藁本内酯浓度在 $15 \sim 40 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内呈良好线性。当底物浓度低于 $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,按回归方程①计算;高于 $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,按回归方程②计算。最低定量限为 $2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (信噪比为 10),最低检测限为 $0.4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (信噪比为 3)。

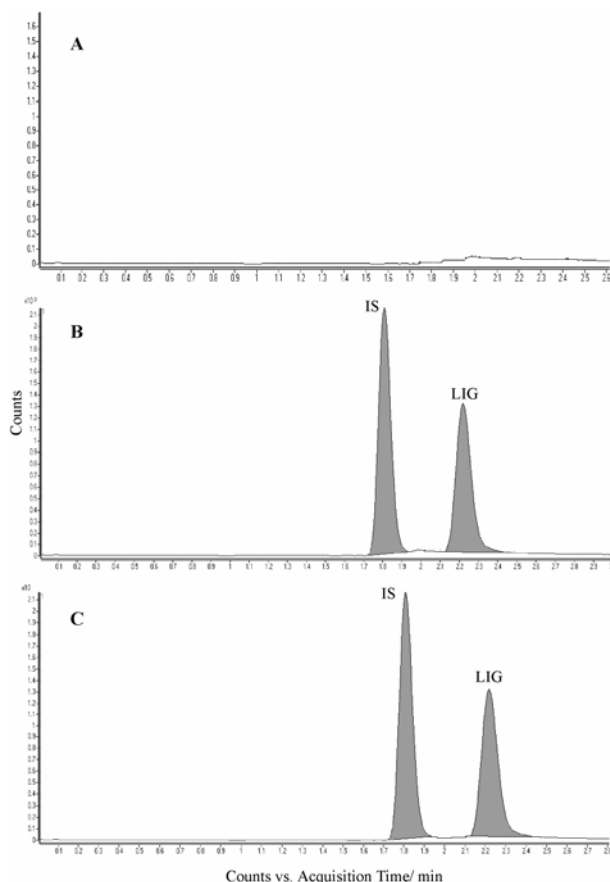


Figure 7 MRM gram of nitrendipine (IS) and ligustilide (LIG). A: Blank CYP; B: Standard CYP with IS and LIG; C: CYP sample

1.5 提取回收率 分别于灭活的肝微粒体稀释液中加入高、中、低浓度的藁本内酯溶液,按“线性与范围”项下的方法测定。以藁本内酯和内标的流动相溶液为对照,内标法计算提取回收率,结果见表 1。

Table 1 Recovery of ligustilide extracted from CYP ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

Add concentration $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Recovery / %	RSD / %
2	87.24 ± 6.19	7.10
20	93.76 ± 5.94	6.34
40	95.18 ± 4.37	4.60

1.6 精密度与准确度 分别于灭活的肝微粒体中加入高、中、低浓度藁本内酯标准液,按“线性与范围”项下的方法测定。以藁本内酯和内标的流动相为对照,按“线性与范围”项回归方程计算日内、日间精密度和准确度,结果见表 2。

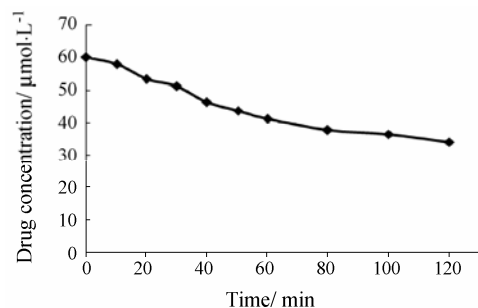
2 影响因素实验

2.1 孵育时间对藁本内酯体外代谢的影响 通过对温孵不同时间后,藁本内酯代谢量的变化曲线(图 8)可见:当酶质量浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,底物浓度为 $60 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

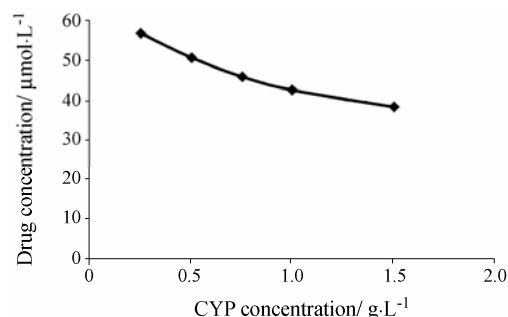
Table 2 Inter-day and Intra-day precision and accuracy of the method ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

Add concentration / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Found concentration / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Precision RSD /%	Accuracy /%
Intra-day			
2	2.04 ± 0.14	6.78	102.17
20	20.05 ± 0.92	4.59	100.23
40	39.22 ± 3.58	9.13	98.04
Inter-day			
2	2.07 ± 0.11	5.37	103.26
20	20.27 ± 1.77	8.75	101.34
40	39.13 ± 0.87	2.19	97.82

时, 底物藁本内酯在 0~60 min 内呈线性消除关系; 藁本内酯代谢量对孵育时间的线性回归方程为 $y = 0.326x - 0.369$ ($r = 0.9955$)。此条件下, 藁本内酯在体外肝微粒体中 60 min 代谢量约为所加入底物的 30%。选择线性范围内底物被代谢量小于 20% 的时间点 30 min 作为最佳温孵时间^[11], 用于酶促反应动力学参数的测定实验。

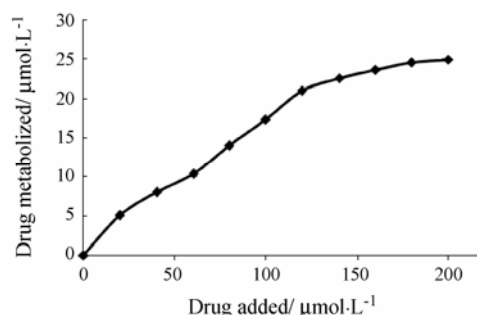
**Figure 8** Concentration-time curve of ligustilide *in vitro*

2.2 酶浓度对藁本内酯体外代谢的影响 通过不同酶浓度温孵后, 藁本内酯代谢量的变化曲线 (图 9) 可见: 当温孵时间为 30 min, 底物浓度为 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 肝微粒体蛋白质质量浓度在 0.25~1.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对底物藁本内酯的代谢呈线性消除关系; 藁本内酯代谢量对酶浓度的线性回归方程为 $y = 18.85x - 0.755$ ($r = 0.9905$)。藁本内酯为脂溶性药物, 为了减少因药

**Figure 9** Concentration-CYP curve of ligustilide *in vitro*

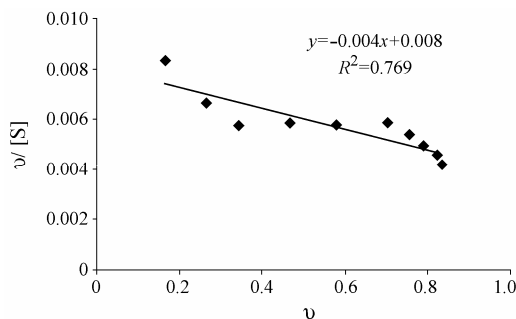
物与蛋白结合而对药物测定的影响, 选择线性范围内肝微粒体蛋白最佳酶浓度^[11]为 0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 用于酶促反应动力学参数的测定实验。

2.3 底物浓度对藁本内酯体外代谢的影响 通过不同浓度的底物温孵后, 由藁本内酯代谢量的变化曲线 (图 10) 可见: 当肝微粒体蛋白质量浓度为 0.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 不同浓度的底物温孵 30 min 后, 底物浓度在 0~120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间藁本内酯的代谢呈线性消除关系; 藁本内酯代谢量对底物浓度的线性回归方程为 $y = 0.167x + 0.750$ ($r = 0.9965$), 当底物浓度大于 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 呈现代谢饱和现象。

**Figure 10** Concentration-drug added curve of ligustilide *in vitro*

3 酶促反应动力学参数

将“2.3”项实验结果根据 Lineweaver-Burk 作图法, 以 $1/V$ 对 $1/[S]$ 进行线性回归, 得到回归方程为 $y = 111.3x + 0.668$, $r = 0.9945$ 。由此计算得到最大反应速度 $V_{\max}$ 为 1.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ (蛋白), 米氏常数 K_m 为 166.62 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 内在代谢清除率 CL_{int} 为 8.99 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ (蛋白)。以 Scatchard 作图法对不同底物浓度的代谢结果进行比较 (图 11), 以 v 对 $v/[S]$ 作图, 结果显示线性关系不明显, 表明藁本内酯的代谢可能由不止一种的酶所催化。

**Figure 11** $v-v/[S]$ graph of different ligustilide concentrations

4 代谢抑制实验

各选择性抑制剂存在时, 藁本内酯肝微粒体中体外代谢的变化见图 12, 各种特异性抑制剂对藁本内

酯代谢的影响关系为酮康唑 > 甲氧苄啶 > α -萘黄酮 > 奥美拉唑、4-甲基吡唑、奎尼丁。提示, CYP3A4、CYP2C9 和 CYP1A2 是参与藁本内酯代谢的主要代谢酶; CYP2C19、CYP2E1 和 CYP2D6 没有明显地参与催化藁本内酯的代谢。

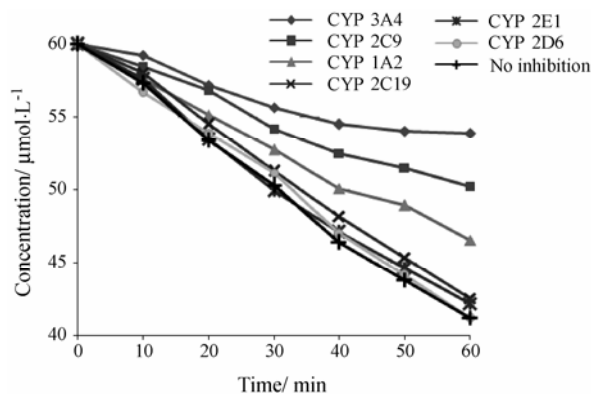


Figure 12 Concentration-time graph of ligustilide with inhibitors *in vitro*

讨论

Agilent 6410 三重串联四级杆高效液相-质谱联用仪用于定量分析时, 定量碎片离子的选择原则为远离母离子、裂解方式稳定、质荷比稳定且左右干扰少以及碎片离子有足够的丰度。据此原则分别选择了藁本内酯和尼群地平含量测定的定量离子。同时优化了主要质谱参数碰撞电压和碰撞能量, 以期在定量离子稳定的同时丰度尽可能高。

References

- [1] Chan SS, Cheng TY, Lin G. Relaxation effects of ligustilide and senkyunolide A, two main constituents of Ligusticum chuanxiong, in rat isolated aorta [J]. J Ethnopharmacol, 2007, 111: 677–680.
- [2] Cao YX, Zhang W, He JY, et al. Ligustilide induces vasodilatation *via* inhibiting voltage dependent calcium channel and receptor-mediated Ca^{2+} influx and release [J]. Vascu Pharmacol, 2006, 45: 171–176.
- [3] Liang MJ, He LC, Yang GD. Screening, analysis and *in vitro* vasodilatation of effective components from Ligusticum chuanxiong [J]. Life Sci, 2005, 78: 128–133.
- [4] Kuang X, Yao Y, Du JR, et al. Neuroprotective role of Z-ligustilide against forebrain ischemic injury in ICR mice [J]. Brain Res, 2006, 1102: 145–153.
- [5] Zhang GY, Du JR, Kuang X, et al. Therapeutic effects and its mechanism of angelica lactone on focal cerebral ischemia in rats [J]. West China J Pharm Sci (华西药理学杂志), 2006, 21: 114–117.
- [6] Peng HY, Du JR, Zhang GY, et al. Neuroprotective effect of Z-ligustilide against permanent focal ischemic damage in rats [J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30: 309–312.
- [7] Lu Q, Qiu TQ, Yang H. Ligustilide inhibits vascular smooth muscle cells proliferation [J]. Eur J Pharmacol, 2006, 542: 136–140.
- [8] Shi LF, Zhang XM. Comparison of influence of essential oil from Ligusticum Chuanxiong Hoert. on microcirculation in rabbit conjunctive bulbar before and after decomposition of ligustilide [J]. Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志), 1995, 9: 157–158.
- [9] Yan R, Ko NL, Li SL. Pharmacokinetics and metabolism of ligustilide, a major bioactive component in Rhizoma Chuanxiong, in the rat [J]. Drug Metab Dispos, 2008, 36: 400–408.
- [10] An DK. Selected Topics on Modern Pharmaceutical Analysis (现代药物分析选论) [M]. Beijing: China Medicine Technology Press, 2001: 622–624.
- [11] Zeng S. Drug Metablism (药物代谢学) [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2004: 264–265.