

微透析采样考察麻黄-桂枝药对配伍对麻黄碱药代动力学的影响

郑芳昊¹, 罗佳波^{2*}

(1. 佛山市中医院, 广东 佛山 528000; 2. 南方医科大学 中医药学院, 广州 510515)

[摘要] 目的:考察麻黄-桂枝药对配伍对麻黄碱药代动力学的影响。方法:通过考察流速、药物浓度等因素,确立适合麻黄碱微透析采样的技术条件。采用微透析采样技术,分别收集大鼠给予麻黄碱、麻黄和麻黄-桂枝药对配伍水煎液的血液透析液样品,通过 LC-MS 测定给药不同时间的麻黄碱浓度。采用 DAS 3.0 软件进行非房室模型拟合,比较不同给药组间的药动学差异。结果:麻黄碱微透析采样的技术条件为流速 $1.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 取样间隔 20 min, 样品质量浓度 $0.1\sim 3.0 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。不同组别间药-时曲线下面积 (AUC) 无显著性差异。与麻黄碱组相比,麻黄-桂枝 (3:2) 配伍组的达峰时间 (T_{max}) 和药峰浓度 (C_{max}) 均无显著性差异;消除半衰期 ($T_{1/2}$) 和平均驻留时间 (MRT) 显著缩短,表观分布容积/生物利用度 (V_z/F) 显著降低,清除率/生物利用度 (CL_z/F) 显著增加。与麻黄组相比,配伍组 C_{max} 无显著性差异; T_{max} 显著降低, $T_{1/2}$ 和 MRT 显著缩短, V_z/F 显著降低, CL_z/F 显著增加。结论:麻黄-桂枝药对配伍后加速了麻黄碱在体内的代谢,可能是桂枝降低麻黄相对毒性的作用机制之一。

[关键词] 麻黄; 桂枝; 药对; 微透析; 药代动力学; 麻黄碱

[中图分类号] R969.1;R284.1;R284.2;R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)16-0080-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016160080

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160705.1446.032.html>

[网络出版时间] 2016-07-05 14:46

Pharmacokinetics of Ephedrine in Rats Treated with Herb Pair of Ephedrae Herba-Cinnamomi Ramulus by Microdialysis

ZHENG Fang-hao¹, LUO Jia-bo^{2*}

(1. Foshan Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), Foshan 528000, China;

2. School of TCM, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of compatibility of Ephedrae Herba-Cinnamomi Ramulus on pharmacokinetics of ephedrine in rats by microdialysis. **Method:** The suitable microdialysis sampling technical conditions of ephedrine were developed by investigating the velocity, the concentration of ephedrine and other factors. Rat plasma samples were collected by microdialysis sampling technique, Rats were given ephedrine, Ephedrae Herba and herb pair of Ephedrae Herba-Cinnamomi Ramulus solutions. The concentration of ephedrine was determined by LC-MS at different times. Pharmacokinetic differences of three groups were compared by DAS 3.0 software. **Result:** The suitable conditions of microdialysis for ephedrine were the velocity of $1.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, sample interval for 20 min and sample concentration within $0.1\sim 3.0 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. There were no difference of AUC in three groups. Compared with the ephedrine group, T_{max} and C_{max} of the Ephedrae Herba-Cinnamomi Ramulus (3:2) group had no statistical significance; while their $T_{1/2}$, MRT, CL_z/F and V_z/F had statistical significance.

[收稿日期] 20151014(012)

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81030066)

[第一作者] 郑芳昊,博士,从事中药新药研究与开发,Tel:0757-81092010,E-mail:530437860@qq.com

[通讯作者] * 罗佳波,教授,从事中药新药研究与开发,Tel:020-62789112,E-mail:ljb@fimmu.com

By comparing with the Ephedrae Herba group, C_{max} of the Ephedrae Herba-Cinnamomi Ramulus (3:2) group had no statistical significance, but their T_{max} , $T_{1/2}$, MRT, CL_z/F and V_z/F had statistical significance. **Conclusion:** Compatibility of Ephedrae Herba-Cinnamomi Ramulus accelerates the metabolism of ephedrine, and it may be the reason why Ephedrae Herba is relatively safe when compatibility with Cinnamomi Ramulus.

[**Key words**] Ephedrae Herba; Cinnamomi Ramulus; herb pair; microdialysis; pharmacokinetics; ephedrine

麻黄汤是中医治疗风寒表实证的经典方剂,始载于张仲景《伤寒论》,由麻黄(去节,三两),桂枝(去皮,二两),甘草(炙,一两)和杏仁(去皮尖,70个)组成^[1]。其中麻黄和桂枝是发挥药效的主要药味。大量研究表明麻黄-桂枝配伍可增强药物的发汗作用,缓解患者的发热、鼻塞、咳喘等症状^[2-6]。但由于麻黄碱对中枢神经系统和心血管系统的毒副作用,有些国家将麻黄列为有毒的天然植物添加剂^[7-11]。然而,麻黄在我国传统医学中作为解表第一要药,具有悠久的历史 and 不可替代的药用价值,鲜见其相关毒副作用的报道。推测麻黄-桂枝药对配伍除了具有相须作用外,可能还存在相杀作用。这可能是麻黄作为中药在临床使用中相对安全的一个重要原因。

麻黄碱化学性质稳定,在体内几乎以原型存在。麻黄-桂枝药对配伍后,可能会影响麻黄碱的体内代谢过程,从而减轻麻黄碱的毒副作用。但传统的血液取样方法不仅容易造成动物因体液损失而引起药物代谢行为的改变,且长时间取样也容易使动物因失血过多而死亡,微透析采样技术有效克服了上述缺点。本实验拟借助微透析技术进行采样,考察麻黄-桂枝药对配伍后对麻黄碱药代动力学的影响,为揭示麻黄-桂枝药对配伍的合理性提供科学依据。

1 材料

RWD302 型微透析系统(深圳市瑞沃德生命科技有限公司),1200 系列高效液相色谱仪和 6410 型 Triple Quad 液质联用仪(美国安捷伦科技有限公司)。盐酸麻黄碱对照品(赤峰艾克制药科技有限公司,批号 060307,纯度 99.8%),水为蒸馏水,乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为市售分析纯;麻黄(批号 110901,产地吉林)和桂枝(批号 121001,产地广西)均购自广州致信中药饮片有限公司,经南方医科大学中药鉴定教研室马骥教授鉴定,分别为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* 的干燥草质茎,樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* 的干燥嫩枝。

SPF 级雄性 SD 大鼠,18 只,体重 180 ~ 220 g,购于南方医科大学实验动物中心,动物合格证号

SCXK(粤)2011-0015。采用随机方法将动物分组,每组 6 只,分别给予麻黄碱、麻黄、麻黄-桂枝药对水煎液。

2 方法与结果

2.1 药液的配置 精密称取麻黄碱对照品适量,加水制成 $4.80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 对照品溶液,作为麻黄碱组试液。称取麻黄药材,加 10 倍量水浸泡 30 min,煎煮 20 min,去沫,再煎 30 min,定容,浓缩至 $1.50 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,作为麻黄组试液。称取麻黄药材,加 10 倍量水浸泡 30 min,煎煮 20 min,去沫,按麻黄汤原方配比加入桂枝药材,煎煮 30 min,定容,按麻黄质量计,浓缩至 $1.85 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,作为麻黄-桂枝(3:2)组试液^[12]。称取氯化钠、氯化钙、氯化钾 4 300,122.1,149.0 mg,用水溶解并定容至 500 mL,加稀盐酸调 pH 7.4,经 $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,得 Ringer's 液。

2.2 微透析法收集血液透析液

2.2.1 血液透析液与血液探针的预处理 将配制好的 Ringer's 液用 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 水系微孔滤膜过滤 2 次,备用。使用之前,超声脱气 20 min。新探针使用前,将其浸泡于水中以 $2 \text{ } \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速灌流 > 2 h,充分冲洗掉透析膜上的杂质,备用。体内试验前,将活性透析膜浸泡于肝素钠注射液中 > 20 min,使膜内外充分饱和肝素钠。

2.2.2 微透析手术 将大鼠用 20% 乌拉坦($0.106 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$)麻醉,插入胃管,分离右颈静脉,插入血管探针。让大鼠俯卧,固定大鼠于脑立体定位仪上。在微量灌注泵的灌注下,以 $1 \text{ } \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 灌注空白 Ringer's 液,平衡 2 h。给药前采集微透析液作为空白样品。按 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 灌胃给药后,采用自动低温收集器采集透析液样品, $-80 \text{ } ^\circ\text{C}$ 保存待测。

2.2.3 供试品的制备 以体积比 1:1 混合待测透析液和内标溶液后立即进行 LC-MS 分析^[13]。

2.3 微透析采样条件的确立

2.3.1 流速对体内回收率的影响 血液探针植入平衡后,采用麻黄碱对照品质量浓度 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ringer's 液在不同流速 ($1.0, 1.5, 2.0, 2.5 \text{ } \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$) 下灌注探针。各个流速收集 5 份微透析样

品,每份 40 μL ,分别测定血液透析液(C_1)和含药 Ringer's 液(C_2)中麻黄碱的含量,按公式 $RL = (C_2 - C_1)/C_2 \times 100\%$ 计算体内相对损失率(RL)分别为 $(18.80 \pm 0.51)\%$, $(21.36 \pm 0.83)\%$, $(30.04 \pm 1.45)\%$, $(39.48 \pm 1.98)\%$,按公式 $RR = C_1/C_2 \times 100\%$ 计算回收率(RR)分别为 $(81.20 \pm 0.51)\%$, $(78.64 \pm 0.83)\%$, $(69.96 \pm 1.45)\%$, $(60.52 \pm 1.98)\%$ 。考虑到流速 $1.5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 与 $1.0 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 之间的回收率差异不大,故选择透析流速 $1.5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.3.2 药物浓度对体内回收率的影响 血液探针植入平衡后,采用含不同质量浓度(0.1,0.5,1.0,2.0,3.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)麻黄碱对照品的 Ringer's 液分别以 $1.5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速灌注探针。每种质量浓度收集 5 份微透析液样品,每份 30 μL ,计算探针体内相对损失率和回收率平均值分别为 20.64%,79.36%,RSD 依次为 4.4%,1.1%。说明在 0.1~3.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,麻黄碱质量浓度对探针回收率无明显影响。

2.3.3 体内回收率的稳定性考察 血液探针植入平衡后,采用麻黄碱对照品质量浓度 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的

Ringer's 液以 $1.5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速灌注探针,每 20 min 收集 1 次透析液,灌注 6 h。6 h 内麻黄碱平均回收率 79.03%,RSD 0.7%。说明在 6 h 内,探针回收率无明显变化,半透膜稳定性良好。

2.4 药对配伍对麻黄碱药代动力学的影响 采用确立的微透析条件进行采样,测定不同时间点微透析样品中麻黄碱的含量。采用 DAS 3.0 软件进行非房室模型拟合,绘制药-时曲线,计算药动学参数,见表 1 和图 1。结果发现不同组别间药-时曲线下面积(AUC)无显著性差异($F = 2.087, P = 0.159$)。与麻黄碱组相比,麻黄-桂枝(3:2)组的达峰时间(T_{max})和药峰浓度(C_{max})均无显著性差异(P 分别为 0.056,0.390);消除半衰期($T_{1/2}$)和平均驻留时间(MRT)显著缩短,表观分布容积/生物利用度(V_z/F)显著降低,清除率/生物利用度(CL_z/F)显著增加,差异具有统计学意义(P 分别为 0.01,0,0,0)。与麻黄组相比,麻黄-桂枝(3:2)组 C_{max} 无显著性差异($P = 0.056$); T_{max} 显著降低, $T_{1/2}$ 和 MRT 显著缩短, V_z/F 显著降低, CL_z/F 显著增加,差异具有统计学意义(P 分别为 0.029,0.006,0,0,0)。

表 1 药对配伍对麻黄碱药代动力学主要参数的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of herb pair on main pharmacokinetic parameters of ephedrine($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	麻黄碱组	麻黄组	麻黄-桂枝(3:2)组
AUC	$\text{h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	4 206.00 \pm 465.63	4 355.60 \pm 448.91	4 691.33 \pm 338.74
T_{max}	h	1.33 \pm 0.37	1.33 \pm 0.19	1.03 \pm 0.15 ²⁾
C_{max}	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	1 188.96 \pm 165.97	1 076.11 \pm 98.88	1 254.14 \pm 107.42
$T_{1/2}$	h	3.57 \pm 0.39	3.62 \pm 0.36	3.02 \pm 0.19 ^{1,2)}
MRT	h	4.35 \pm 0.21	4.37 \pm 0.28	3.60 \pm 0.36 ^{1,2)}
CL_z/F	$\text{mL} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}$	3.43 \pm 0.29	3.63 \pm 0.13	4.37 \pm 0.31 ^{1,2)}
V_z/F	$\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$	42.63 \pm 2.71	44.96 \pm 2.84	33.25 \pm 3.04 ^{1,2)}

注:与麻黄碱组比较¹⁾ $P < 0.05$;与麻黄组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

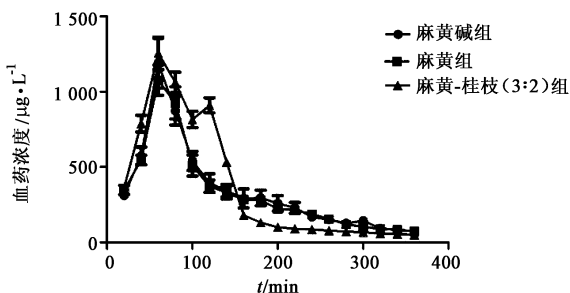


图 1 不同组别大鼠血浆中麻黄碱的药-时曲线($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Concentration-time curves of ephedrine in rat plasma of different groups($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 讨论

3.1 微透析采样条件分析 微透析过程中,流速是

影响探针回收率大小的重要因素。流速越快,灌流液流经透析膜时膜内外药物的平衡时间就越短,回收率就越低。反之,流速越慢,透析膜内外溶液的扩散越易接近平衡,因此相对回收率较高。本实验结果表明随着流速的增加,麻黄碱体内回收率呈明显降低趋势。另外,流速越低,透析膜内外药物的平衡时间较长,则样品浓度越高,可降低样品对分析仪器的检测限要求,越有利于样品分析,且可减小取样过程对局部组织生理状态的扰动。但流速过慢,为满足仪器分析对样品量的要求,需要延长取样时间。而单次取样时间过长,将会损失部分药物浓度变化的信息,难以真正监测体内药物水平的变化。因此,

在进行微透析试验时,需要考察微透析的灌注速度、取样时间及药物浓度等因素对回收率的影响,尽量选择相对较高的灌注液流速以提高微透析采样的时间分辨性,并且采用较灵敏的检测手段。本实验成功建立了微透析技术用于麻黄碱体内采样的方法,既可保证样品的回收率,又可满足分析仪器对进样量的要求。

3.2 麻黄碱药物代谢过程分析 贺丰等^[14-16]通过体内实验研究发现麻黄-桂枝配伍后,桂枝对麻黄碱的吸收和消除快慢无显著影响,但可以促进人体对麻黄碱的吸收利用程度(提高 C_{\max} 和 AUC),从而提高麻黄碱的药理效应。此外,桂枝通过减小麻黄碱的 V_z ,阻碍麻黄碱从血液向组织内部的分布,有利于减少麻黄碱的体内蓄积,对降低麻黄碱的毒性有一定意义。本实验结果与这些文献的结果并不完全一致。一方面,可能是因为试验对象存在差异,文献中选择对象是人,而本试验对象为大鼠,无论是体型还是行为方式都存在较大差异。另一方面,可能是取样方式存在差异,文献采用的血液取样方式重复性较差,个体之间的差异对结果影响较大。但本实验结果与文献的结果总体趋势是一致的。本实验中麻黄-桂枝药对配伍后,麻黄碱的 C_{\max} 和 AUC 均有所提高,虽未达到统计学差异,但已具有增加麻黄碱 F 的趋势。与麻黄组相比, $T_{1/2}$ 和 MRT 显著缩短, V_z/F 显著降低, CL_z/F 显著增加,说明桂枝加快了麻黄碱的代谢,减少了体内滞留时间,避免了麻黄碱在体内的蓄积毒性,这与文献的部分研究结果是一致的。本实验成功建立了微透析技术用于麻黄碱体内采样的方法。在此基础上,考察了麻黄-桂枝药对配伍对麻黄碱体内代谢的影响,从药代动力学角度阐释了麻黄-桂枝药对配伍后可减轻麻黄碱毒副作用的科学合理性。

[参考文献]

[1] 陈亦人. 伤寒论译释[M]. 上海:上海科学技术出版社,2010:13.
[2] 徐文杰,陈飞龙,谢颖,等. 不同配伍对比对麻黄-桂枝药对有效成分含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):84-88.
[3] 刘国清,罗佳波. 麻黄汤不同配伍对大鼠发汗作用的影响[J]. 中药新药与临床药理,2005,16(5):318-320.

[4] 朱秋双,任春清,刘蕾,等. 麻黄汤不同配伍解热药效实验研究[J]. 黑龙江医药科学,2005,28(2):12-13.
[5] 刘永刚,罗佳波,贺丰. 麻黄汤及拆方抗炎作用的研究[J]. 中药材,2005,28(5):413-415.
[6] 朱秋双,刘蕾,任春清,等. 麻黄汤配伍解热药效实验研究[J]. 黑龙江医药科学,2004,27(5):13-14.
[7] Haller C A, Benowitz N L. Adverse cardiovascular and central nervous system events associated with dietary supplements containing ephedra alkaloids[J]. N Engl J Med,2000,343(25):1833-1838.
[8] Singh A, Rajeev A G, Dohrmann M L. Cardiomyopathy associated with ephedra-containing nutritional supplements[J]. Congest Heart Fail, 2008, 14(2):89-90.
[9] Maglione M, Miotto K, Iguchi M, et al. Psychiatric effects of ephedra use: an analysis of Food and Drug Administration reports of adverse events[J]. Am J Psychiatry,2005,162(1):189-191.
[10] Miller S C. Psychiatric effects of ephedra: addiction[J]. Am J Psychiatry,2005,162(11):2198.
[11] 陆斌. 麻黄或与其他兴奋剂合用易致严重不良反应[J]. 药物不良反应杂志,2002,4(4):275-276.
[12] Zheng F H, Wei P, Huo H L, et al. Neuroprotective effect of Gui Zhi (*Ramulus cinnamomi*) on Ma Huang-(*Herb Ephedra*-) induced toxicity in rats treated with a Ma Huang-Gui Zhi herb pair[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2015, doi:10.1155/2015/913461.
[13] Wei P, Huo H L, Ma Q H, et al. Pharmacokinetic comparisons of five ephedrine alkaloids following oral administration of four different Mahuang-Guizhi herb-pair aqueous extracts ratios in rats [J]. J Ethnopharmacol,2014,155(1):642-648.
[14] 贺丰,罗佳波,陈飞龙,等. 麻黄汤中麻黄碱、伪麻黄碱在人体药代动力学研究[J]. 中药药理与临床,2005,21(1):1-3.
[15] 贺丰,罗佳波. 麻黄汤中臣、佐、使药对君药中麻黄碱的人体内过程的影响[J]. 中草药,2005,36(9):1313-1316.
[16] 贺丰,罗佳波. 麻黄汤中臣佐使药对君药中伪麻黄碱的人体药代学的影响[J]. 中国中药杂志,2005,30(18):1454-1457.

[责任编辑 刘德文]