

喘平方在大鼠与人体内药代动力学参数比较

欧维业, 黄娟萍, 蔡延渠, 张雄飞, 李碧云, 彭亮, 朱盛山*
(广东药学院中药开发研究所, 广州 510006)

[摘要] **目的:**比较喘平方在大鼠与人体内药代动力学参数。**方法:**采用 HPLC 测定 SD 大鼠血液与人尿中麻黄碱和伪麻黄碱质量浓度,通过 3P87 软件计算大鼠血液中药代动力学参数,尿药亏量法计算人尿中药代动力学参数。**结果:**喘平方在大鼠体内与人体内药代动力学参数不尽相同。复方中麻黄与洋金花相互作用对麻黄碱、伪麻黄碱在大鼠体内的代谢无明显影响,但对 2 种成分在人体内代谢有影响,**结论:**药物高剂量给药在动物体内代谢过程与正常服用剂量在人体内代谢过程存在差异,动物高剂量给药试验不能如实反映药物在人体内代谢过程。

[关键词] 喘平方; 中药药代动力学; 药代动力学参数; 麻黄碱; 伪麻黄碱

[中图分类号] R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0162-05

[doi] 10.11653/syfy2013150162

Comparative Analysis of *in vivo* Pharmacokinetic Parameters of Chuanping Compound in Rats and Human

OU Wei-ye, HUANG Juan-ping, CAI Yan-qu, ZHANG Xiong-fei, LI Bi-yun, PENG Liang, ZHU Sheng-shan*
(Research & Development Institute of Chinese Materia Medica of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To compare *in vivo* pharmacokinetic parameters of Chuanping compound in rats and human. **Method:** HPLC was adopted for determining the concentration of ephedrin and pseudoephedrine in SD rats blood and human urine, pharmacokinetic parameters in rats blood and human urine were calculated by 3P87 software and urine drug deficiency, respectively. **Result:** Pharmacokinetic parameters of chuanping compound in rats and human were not the same, interaction of *Ephedra sinica* and *Datura metel* had no significant effect on metabolism of ephedrin and pseudoephedrine in rats, but it had influence in human. **Conclusion:** Metabolic process was different between drugs with high dosage in animals and drugs with normal dose in human. *In vivo* metabolic process of animals with high dosage could not accurately reflect drugs in human.

[Key words] Chuanping compound; Chinese medicine pharmacokinetics; pharmacokinetic parameters; ephedrin; pseudoephedrine

药代动力学参数能定量地反映药物在体内的动态变化过程,是临床制定和调整给药方案的重要依

据^[1-2]。喘平方处方来源于国家“十二五”重大新药创制专项,疗效确切^[3-8]。方中主药麻黄含有多种有机胺类生物碱,其中麻黄碱和伪麻黄碱为主要有效成分^[10]。本实验拟采用 HPLC 测定 SD 大鼠血药浓度与人尿药浓度,通过 3P87 软件计算喘平方在大鼠血液中药代动力学参数,尿药亏量法计算人尿中药代动力学参数,比较大鼠与人体药代动力学参数的差异,分析高剂量给药与正常剂量的差异,阐明药物在动物与人体内代谢过程的区别。

[收稿日期] 20130315(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973954)

[第一作者] 欧维业, 硕士, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel:020-39352540, E-mail:253452028@qq.com

[通讯作者] * 朱盛山, 教授, 博士生导师, 从事传统中药制剂技术现代化研究, Tel:020-39352539, E-mail: zhush3@126.com

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),TGL-20M 型高速冷冻离心机(长沙维尔康湘鹰离心机有限公司),VortexQL-901 型涡旋器(海门市其林贝尔仪器制造公司),BS124S 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司),MTN-2800D 型氮吹浓缩仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司),SZ-97 型自动化三重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

麻黄、洋金花(购自广州清平市场,经广东药学院朱盛山教授鉴定,麻黄为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf 的干燥草质茎,洋金花为茄科植物白花曼陀罗 *Datura metel* L. 的干燥花),喘平方提取液、洋金花提取液、麻黄提取液及相应片剂均由广东药学院中药开发研究所提供,盐酸伪麻黄碱对照品(国家麻醉品实验室,批号 1237-200103),盐酸麻黄碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 171241-200506),乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

SPF 级 SD 大鼠购自广东省医学实验动物中心,许可证号 SCXK 粤 2008-0002。

2 方法与结果

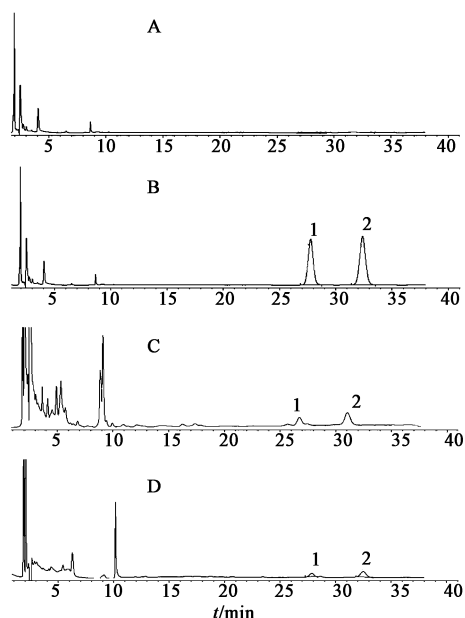
2.1 大鼠体内药代动力学研究

2.1.1 给药方法与样品采集 取 SD 大鼠 12 只,随机分为 2 组,每组 6 只,雌雄各半,试验前禁食 12 h,不禁水,称重,按 $119 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量给药,第 1 组灌服麻黄单提物,第 2 组灌服喘平方提取物。分别于给药后 5, 10, 20, 30, 50, 70, 90, 120, 150, 180, 240 min 眼眶取血 0.2 ~ 0.3 mL,置于 0.5 mL 肝素化试管中,以 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,精密吸取血浆 150 μL ,于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存,待测^[9]。

2.1.2 色谱条件 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm , Phenomenex 保护柱),流动相甲醇-0.001 mol·L⁻¹ 磷酸(含 0.02 mol·L⁻¹ 十二烷基硫酸钠),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm,柱温 25 $^\circ\text{C}$,见图 1。

2.1.3 含药血浆样品的处理 取待测含药血浆,加入 0.4 倍量混合碱试液[Na₂CO₃-NaOH(1:1)],混匀 1 min,加入乙醚-正己烷(1:4)4 mL,涡旋 5 min,于 $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,吸出下层液,加入等血浆体积的 0.01 mol·L⁻¹ 硫酸,涡旋 5 min, $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,下层液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,按上述色谱条件进样。

2.1.4 线性关系的考察 取空白血浆 0.5 mL,加入不同量的麻黄碱、伪麻黄碱对照品溶液,配成麻黄



A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 混合对照品; C. 麻黄单提物血浆;
D. 喘平方血浆; 1. 伪麻黄碱; 2. 麻黄碱

图 1 血浆样品 HPLC

碱质量浓度为 5, 11.52, 126.72, 199.68, 276.48 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 伪麻黄碱质量浓度为 4.416, 11.01, 80.74, 139.46, 176.16 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列溶液,按 2.1.3 项下方法处理($n=5$),进样 10 μL ,测定峰面积。以麻黄碱、伪麻黄碱质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y_{\text{麻黄碱}} = 1\,481.1X - 12.85$ ($R^2 = 0.999\,4$), $Y_{\text{伪麻黄碱}} = 1\,426.7X - 15.888$ ($R^2 = 1$),表明麻黄碱、伪麻黄碱分别在 5 ~ 276.48, 4.416 ~ 176.16 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与峰面积呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验 取空白血浆 0.5 mL,加入不同量的麻黄碱、伪麻黄碱对照品溶液,配成麻黄碱质量浓度 11.52, 126.72, 220.9 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 伪麻黄碱质量浓度 11.01, 80.74, 145.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血浆样品,按 2.1.3 项下方法处理,测定日内与日间精密度,结果 RSD 均 < 5%,表明该方法精密度良好。

2.1.6 加样回收率试验 取空白血浆 0.5 mL,加入不同量的麻黄碱、伪麻黄碱对照品溶液,配成 2.1.5 项下血浆样品,按 2.1.3 项下方法处理,测定,结果麻黄碱平均回收率分别为 113.51% (RSD 2.14%), 97.16% (RSD 2.65%), 97.59% (RSD 2.71%), 伪麻黄碱平均回收率依次为 96.25% (RSD 3.24%), 101.49% (RSD 2.64%), 101.10% (RSD 1.98%)。

2.1.7 稳定性试验 取空白血浆 0.5 mL,加入不同量的麻黄碱、伪麻黄碱对照品溶液,配成 2.1.5 项下血浆样品,分别置室温、冻融、冰冻条件下存放不

同时间,按 2.1.3 项下方法操作,结果麻黄碱、伪麻黄碱在室温条件下 24 h 内稳定(RSD 1.79%),冰融 ≤ 5 次稳定(RSD 1.68%),冰冻条件下 8 d 内稳定(RSD 1.97%),满足测定要求。

2.1.8 药动学参数 采用 3P87 药动学软件处理测得的血药浓度数据,分别按单室、二室模型进行模

拟,获得 AIC 和相关系数(R^2),根据 AIC 值最小和 R^2 值最大原则,判定麻黄提取物中麻黄碱和伪麻黄碱在大鼠体内的药动学过程符合单室模型,喘平提取物中麻黄碱和伪麻黄碱在大鼠体内的药动学过程符合单室模型。药时曲线见图 2,药动学参数见表 1。

表 1 在麻黄单提物和喘平复方中药动学参数

参数	单位	麻黄单提物		喘平复方	
		麻黄碱	伪麻黄碱	麻黄碱	伪麻黄碱
A	mg·L ⁻¹	8.26 ± 3.96	4.25 ± 1.48	6.88 ± 3.13	4.53 ± 2.00
ke	min ⁻¹	0.006 ± 0.001	0.005 ± 0.002	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
k _a	min ⁻¹	0.06 ± 0.04	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.04	0.06 ± 0.02
t _{1/2} (ka)	min	17.15 ± 13.13	10.96 ± 6.30	14.01 ± 8.43	14.44 ± 7.35
T _{1/2} (ke)	min	122.00 ± 21.93	134.22 ± 34.74	119.17 ± 70.45	126.99 ± 85.60
T _{peak}	min	52.87 ± 22.19	40.61 ± 11.79	44.73 ± 16.87	46.24 ± 13.50
C _{max}	mg·L ⁻¹	4.70 ± 0.79	2.96 ± 0.37	3.78 ± 0.03	2.50 ± 0.51
AUC	mg·L ⁻¹ ·min	1 132.16 ± 284.52	731.21 ± 156.14	794.00 ± 310.39	551.93 ± 204.49
CL/F(s)	L·kg ⁻¹ ·min	0.18 ± 0.14	0.14 ± 0.03	0.22 ± 0.09	0.20 ± 0.09
V/F(c)	L·kg ⁻¹	28.89 ± 22.47	27.99 ± 9.17	32.02 ± 15.37	29.59 ± 10.61

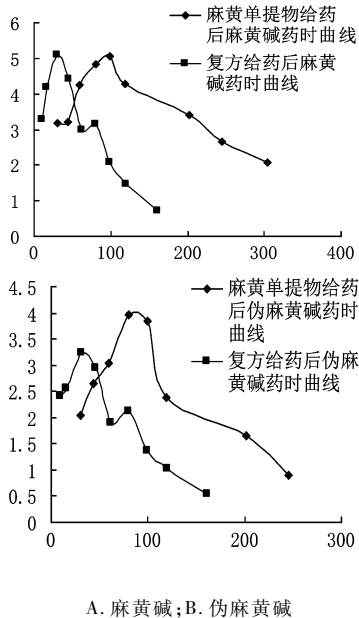


图 2 麻黄碱和伪麻黄碱在麻黄单提物和喘平复方中药时曲线

由表 1 可知,麻黄单提物中麻黄碱达峰时间(T_{peak})大于喘平复方,说明麻黄碱从复方中进入体内的速度及吸收速度较麻黄单提物快,伪麻黄碱正好相反。药时曲线下面积(AUC)表明麻黄碱和伪麻黄碱在复方中吸收程度较麻黄单提小。表观分布容积(V)说明麻黄碱和伪麻黄碱在体内分布的广泛程度复方比麻黄单提大。麻黄碱和伪麻黄碱的消除半衰期,复方与单提物无明显差别,表明麻黄与洋金

花各成分相互作用对麻黄碱的消除过程影响不大。单提物中麻黄碱的最大血药浓度和 AUC 均较复方大,表明麻黄碱和伪麻黄碱在单提物中作用更强,但药效学研究表明,单提组的平喘作用较复方弱,说明中药复方并非由单一成分起作用。

2.2 人体内药代动力学研究

2.2.1 色谱条件 Synergi 4u Polar-RP 80A 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 4 μm, Phenomenex 公司),流动相甲醇-0.092% 磷酸(含 0.04% 三乙胺和 0.02% 二正丁胺),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,检测波长 207 nm,见图 3。

2.2.2 给药方法与样品采集 受试者早晨 8:00 ~ 8:30 空腹饮水 200 mL 排尿,留取尿样作空白;8:30 单剂量口服试药 1 片,用 200 mL 温水送服,10 min 后统一进食早餐,于吃药后 0 ~ 2, 2 ~ 4, 4 ~ 8, 8 ~ 12, 12 ~ 24, 24 ~ 36 h 收集尿样(每次收集尿样后饮水 200 mL),准确称量,记录尿样量。中午 12:00 统一进食标准餐,每日饮水量控制在 2 L 左右,避免剧烈运动,禁服茶、咖啡及其他含咖啡和醇类饮料。

2.2.3 样品处理 取尿样 1 mL,加入内标物,加入等体积混碱溶液(Na₂CO₃-NaOH 1:1),加入 4 倍量二氯甲烷萃取 2 次,萃取液用 N₂ 吹干,用 0.092% 磷酸溶解,过滤,进样测定。

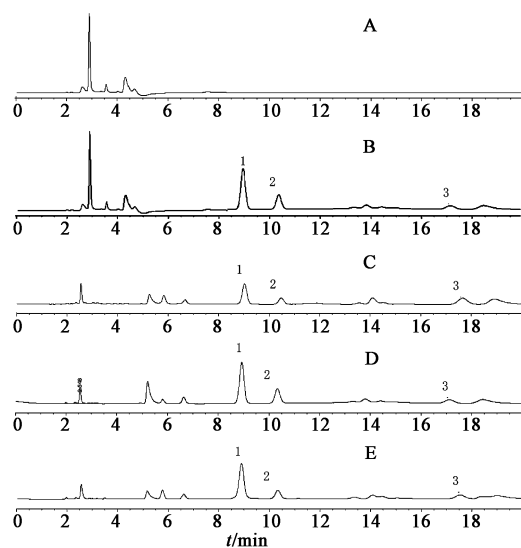


图3 尿液样品 HPLC
A. 空白尿液; B. 空白尿液 + 混标 + 内标物;
C. 复方喘平方尿液; D. 麻黄单提物片尿液;
E. 喘平缓释片尿液; 1. 麻黄碱;
2. 伪麻黄碱; 3. 内标物(苦参碱)

图3 尿液样品 HPLC

2.2.4 线性关系的考察 取空白尿样 1 mL, 加入不同量的麻黄碱、伪麻黄碱对照品溶液, 配成麻黄碱质量浓度为 1.43, 2.86, 5.72, 11.44, 22.88, 45.76 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 伪麻黄碱质量浓度为 1.35, 2.70, 5.39, 10.78, 21.56, 43.12 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列溶液, 按 2.2.3 项下处理方法操作 ($n=5$), 分别进样 10 μL , 测定峰面积。以麻黄碱、伪麻黄碱质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y_{\text{麻黄碱}} = 155.77X + 0.0895$

($R^2 = 0.9995$), $Y_{\text{伪麻黄碱}} = 169.77X - 0.029$ ($R^2 = 0.9993$), 结果表明麻黄碱、伪麻黄碱在 1.43 ~ 45.76, 1.3475 ~ 43.12 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 取空白尿样 1 mL, 加入不同量的麻黄碱、伪麻黄碱对照品液, 配成麻黄碱质量浓度为 22.88, 11.44, 2.86 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 伪麻黄碱质量浓度为 21.56, 10.78, 2.695 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品, 按 2.2.3 项下处理方法操作, 测定日内与日间精密度的 RSD 均 < 5%, 表明分析方法精密度良好。

2.2.6 回收率试验 取空白尿样 1 mL, 加入不同量麻黄碱、伪麻黄碱对照品液, 配成与 2.2.5 项下质量浓度的样品, 按 2.2.3 项下方法处理, 测定, 结果麻黄碱平均回收率分别为 102.8% (RSD 1.78%), 107.2% (RSD 1.67%), 91.5% (RSD 2.05%), 伪麻黄碱平均回收率分别为 103.0% (RSD 1.39%), 107.8% (RSD 2.12%), 108.8% (RSD 1.97%)。

2.2.7 累积排泄率 根据测得尿药浓度和所收集尿液总体积, 计算 6 名健康志愿者口服复方喘平方、麻黄单提取物片、喘平缓释片后各时间段尿中麻黄碱和伪麻黄碱排泄率, 结果复方喘平方平均累积排泄率 (47.29 ± 12.57)%, 麻黄单提取物片平均累积排泄率 (66.65 ± 4.24)%, 喘平缓释片平均累积排泄率 (78.91 ± 10.5)%。

2.2.8 药动学参数 采用尿药亏量法计算各志愿者服药后尿中麻黄碱和伪麻黄碱排泄速率常数 (K) 等参数, 结果见表 2。

表2 志愿者服药后尿中麻黄碱和伪麻黄碱的药动学参数

参数	麻黄单提片		复方喘平方		伪麻黄碱	
	麻黄碱	伪麻黄碱	麻黄碱	伪麻黄碱	麻黄碱	喘平缓释片
T_{max}/h	1.26 ± 0.14	1.42 ± 0.06	1.06 ± 0.10	1.03 ± 0.06	4.08 ± 0.10	4.15 ± 0.16
$(dXu/dt)_{\text{max}}/\text{mg} \cdot \text{h}^{-1}$	0.24 ± 0.13	0.12 ± 0.06	0.20 ± 0.12	0.10 ± 0.04	0.21 ± 0.06	0.10 ± 0.02
K/h^{-1}	0.17 ± 0.03	0.13 ± 0.07	0.17 ± 0.05	0.15 ± 0.04	0.16 ± 0.03	0.14 ± 0.03
Ke/h^{-1}	0.14 ± 0.03	0.18 ± 0.36	0.10 ± 0.39	0.16 ± 0.16	0.22 ± 0.12	0.23 ± 0.09
$T_{1/2}/\text{h}$	3.35 ± 0.45	3.52 ± 0.35	4.39 ± 0.43	4.38 ± 0.69	5.76 ± 0.81	5.82 ± 0.48
X_u/mg	2.79 ± 0.32	1.63 ± 0.35	1.49 ± 0.55	1.05 ± 1.10	3.21 ± 0.65	1.22 ± 0.47

由表 2 可知, 麻黄碱和伪麻黄碱在人体中消除半衰期 ($T_{1/2}$) 顺序均为麻黄单提物 < 复方喘平方 < 喘平缓释片, 且二者在人体中 $T_{1/2}$ 无明显差异, 表明麻黄碱与伪麻黄碱在人体内消除速度为麻黄单提物 > 复方喘平方 > 喘平缓释片, 提示复方中麻黄与洋金花相互作用, 会影响麻黄碱与伪麻黄碱的吸收与代谢过程。

2.3 麻黄碱、伪麻黄碱在人体与大鼠体内药动学比较 由以上结果可知, 在动物体内或人体内, 麻黄碱 $T_{1/2}$ 与伪麻黄碱 $T_{1/2}$ 无明显差别; 在单提物与喘平复方中, 麻黄碱 $T_{1/2}$ 与伪麻黄碱 $T_{1/2}$ 也无明显差别。麻黄碱、伪麻黄碱在大鼠体内的 $T_{1/2}$ 显示单提物与喘平复方无明显差别; 但麻黄碱、伪麻黄碱在人体内的 $T_{1/2}$ 提示单提物与复方喘平方有明显差别。喘平复

方中麻黄碱、伪麻黄碱的 $T_{1/2}$ 与单提物无明显差别,说明复方中麻黄与洋金花相互作用对麻黄碱、伪麻黄碱在大鼠体内的代谢无明显影响;复方喘平片中麻黄碱、伪麻黄碱在人体内 $T_{1/2}$ 与麻黄单提片有明显差别,说明复方中麻黄与洋金花相互作用对麻黄碱、伪麻黄碱在人体内代谢有影响,即药物在动物体内和人体内代谢过程存在差异,选用动物进行药代动力学试验不能如实地反映药物在人体内代谢过程。

3 讨论

由于中药复方成分繁多、干扰因素较多,而且绝大多数药物有效成分含量低,其血、尿和其他组织中浓度更低,又缺乏体内微量定量分析方法,从而导致药物药代动力学试验中给药剂量与人体实际服用量存在一定差异;同时不同剂量药物在体内代谢过程往往不一样,药物可能在人体代谢中存在饱和现象,加大给药剂量考察药物的体内过程,并不能直接反映药物在人体内代谢过程^[11]。

选用 HPLC 测定提取物血药浓度,受检测限的影响,以等于正常服用剂量 15 ~ 25 倍给药,血药浓度存在过饱和现象,其动力学说服力不强。本实验采用 HPLC 测定麻黄、洋金花及其复方提取物在人体内尿药浓度,比较喘平方中各单味药及其复方提取物药代动力学参数,给药剂量选择正常服用剂量,通过数据评价药效成分间是否存在相互作用,比上述测定血药浓度更有意义。

[参考文献]

- [1] 韩玲. 多成分中药药代动力学研究的现状及思考[J]. 中国中药杂志,2008,33(21):2442.
- [2] 吕圭元. 药理学[M]. 北京:中国中医药出版社,2007:31.
- [3] 朱盛山,刘强,郭丽冰,等. 喘平粉末吸入剂麻黄的提取工艺研究[J]. 中国中药杂志,2003,28(8):772.
- [4] 朱盛山,刘强,余林中,等. 不同的提取方法对喘平方主要药效的影响[J]. 中药新药与临床药理,2004,15(1):14.
- [5] 霍务贞,李苑新,姜红宇,等. 阳离子交换树脂纯化喘平方总生物碱的工艺研究[J]. 中药新药与临床药理,2005,16(6):446.
- [6] 李苑新,翟海云,姜红宇,等. 喘平滴丸中主要成分含量测定方法的研究[J]. 中山大学学报,2006,45(3):62.
- [7] 李晓燕,冯中,吴燕红,等. 高效液相色谱法测定喘平滴丸中东莨菪碱的含量[J]. 时珍国医国药,2009,20(6):1377.
- [8] 黄娟萍,张雄飞,罗裕,等. 喘平方对哮喘豚鼠肺泡灌洗液中 IgE、TGF β 1 及 TNF- α 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(11):156.
- [9] 郑虎占,董泽宏,余靖,等. 中药现代研究与应用. 第 5 卷[M]. 北京:学苑出版社,1997:4187.
- [10] 张志鹏,朱盛山,李苑新,等. 大鼠血浆中麻黄碱伪麻黄碱含量的高效液相色谱法测定[J]. 时珍国医国药,2012,23(8):1878.
- [11] 黄娟萍,罗裕,江力,等. 中药药代动力学研究中给药剂量的现状分析[J]. 中国药学杂志,2012,47(21):1685.

[责任编辑 仝燕]