

Cocktail 探针药物法评价羊耳菊对大鼠 CYP450 酶活性的影响

宋菲, 杨健, 王春, 王霞, 李维维, 潘洁, 兰燕宇*, 刘亭*

(贵州医科大学 药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵州省药物制剂重点实验室,
民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 药学院, 贵阳 550004)

[摘要] **目的:**采用 Cocktail 探针药物法考察羊耳菊活性部位提取物(以下均简称为羊耳菊)对 6 种大鼠细胞色素 P450 (CYP450)主要亚型酶活性的影响。**方法:**羊耳菊高、低剂量组大鼠给药剂量分别为 $8.127, 2.709 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (以生药量计算),分别连续灌胃 7, 14 d 后尾静脉注射 Cocktail 探针药物咖啡因、咪达唑仑、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、美托洛尔和氯唑沙宗,不同时间点采集血样,建立超高效液相串联质谱法(UPLC-MS)测定大鼠血浆中 6 种探针药物的浓度,运用 DAS 2.0 软件计算其药动学参数,以考察羊耳菊在大鼠体内对 CYP1A2, CYP3A, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 这 6 种亚型酶代谢活性的影响。**结果:**与空白组相比,奥美拉唑指标下,给药组的药时曲线下面积 AUC_{0-4} 和 $AUC_{0-\infty}$ 增大,14 d 给药组的半衰期($T_{1/2}$)增大,清除率(CL)降低;甲苯磺丁脲指标下,14 d 高剂量组的 AUC_{0-4} , $AUC_{0-\infty}$ 和 $T_{1/2}$ 增大;咖啡因指标下,给药组的 $T_{1/2}$ 明显增大,14 d 给药组的 AUC_{0-4} 和 $AUC_{0-\infty}$ 增大而 CL 降低;但以上 3 个指标的表现分布容积(V)均无明显变化。与空白组相比,咪达唑仑指标下,除 7 d 低剂量组之外,其他给药组的 AUC_{0-4} , $AUC_{0-\infty}$ 和 $T_{1/2}$ 明显增大,CL 明显降低, V 增大;氯唑沙宗和美托洛尔的药动学参数与空白组相比差异没有显著性。**结论:**羊耳菊对大鼠肝药酶 CYP3A, CYP1A2, CYP2C9 和 CYP2C19 的活性具有不同程度的抑制作用,其中对 CYP3A 的抑制作用最强。

[关键词] Cocktail 探针药物法; 羊耳菊; 活性部位; 提取物; 细胞色素 P450; 药物相互作用; 咪达唑仑

[中图分类号] R22; R285; R969.1; R284; R945; O657.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)02-0060-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181905

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180712.0939.006.html>

[网络出版时间] 2018-07-12 11:55

Effect of *Inula cappa* on CYP450 Enzyme in Rats by Cocktail Probe Drugs

SONG Fei, YANG Jian, WANG Chun, WANG Xia, LI Wei-wei, PAN Jie, LAN Yan-yu*, LIU Ting*

(State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou Province, Engineering Research Center for Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To study on the effect of *Inula cappa* extract on the activities of six cytochrome P450 (CYP450) enzymes in rats by Cocktail probe method. **Method:** Rats in the *I. cappa* high and low dose groups were given oral administration of active fractions of *I. cappa* at a dose of $8.127, 2.709 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ of the material for 7, 14 d, respectively. Probe drugs (caffeine, midazolam, tolbutamide, omeprazole, metoprolol, chlorzoxazone) were simultaneously injected to rats after administration. Plasma was collected at different time after

[收稿日期] 20180404(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360680, 81760699);贵州省科学技术厅人才团队项目(黔科合平台人才[2016]5613/5677);贵阳市科研创新团队项目(筑科合同[2017]30-29号)

[第一作者] 宋菲,在读硕士,从事中药药物代谢动力学及质量控制研究, Tel:0851-86908468, E-mail:1130249198@qq.com

[通信作者] *兰燕宇,教授,从事中药药效物质基础及新药开发研究, Tel:0851-86908899, E-mail:yanyu626@126.com;

*刘亭,博士,副教授,从事中药药理研究, Tel:0851-86908468, E-mail:t-liu@163.com

the administration of probe drugs. The plasma concentrations of these six probes were measured by UPLC-MS and their corresponding pharmacokinetic parameters were calculated with DAS 2.0. **Result:** Compared with the control group, only the apparent volume of distribution (V) of midazolam was increased; area under the curve (AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$) and half-life period ($T_{1/2}$) of caffeine, midazolam, tolbutamide and omeprazole were increased and the clearance rate (CL) of them was decreased in rats of *I. cappa* groups. But there were no differences in pharmacokinetic parameters of chlorzoxazone and metoprolol. **Conclusion:** *I. cappa* can reduce the enzymatic activities of CYP3A, CYP1A2, CYP2C9 and CYP2C19 in rats at different degree, among which CYP3A is the strongest.

[Key words] Cocktail probe drug method; *Inula cappa*; active site; extract; cytochrome P450; drug interaction; midazolam

细胞色素 P450 (CYP450) 是药物代谢过程中的关键酶,可介导约 90% 的药物代谢^[1],其活性直接影响到药物的清除,因此国内外均要求测定药物对 CYP450 酶活性的影响,以作为临床合理联合用药的重要依据^[2-3]。Cocktail 探针药物法通过测定特异性探针药物在体内的血药浓度情况,间接反应 CYP450 各亚型酶的活性情况^[4]。因其具有快捷、准确、灵敏度高的特点,成为了研究药物对 CYP450 酶活性影响及药物相互作用的有效方法。

羊耳菊又名山白芷、白牛胆和见消肿等,全草或根入药,其味辛、微苦,性平,具有活血调经、祛痰定喘等作用^[5-8]。目前开发出以羊耳菊为主药的有菊黄上清含片、莲菊感冒胶囊等制剂,这些制剂具有抗菌、抗病毒、抗炎等功效,用于治疗呼吸系统疾病^[9-11],并且通常与其他抗菌药联合使用^[12]。而羊耳菊对 CYP450 酶系的影响尚未见文献报道,联合用药存在发生药物-药物相互作用的风险。本实验参考文献[13-16],采用 Cocktail 探针药物法,以奥美拉唑、咖啡因、甲苯磺丁脲、氯唑沙宗、咪达唑仑和酒石酸美托洛尔为探针药物,考察羊耳菊对 CYP1A2, CYP3A, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 和 CYP2E1 活性的影响,为羊耳菊制剂的临床合理使用提供参考依据。

1 材料

ACQUITY UPLC 型超高压液相色谱-三重四级杆质谱联用仪(美国沃特世公司,含 MassLynx 4.1 质谱工作站),AE240 型 1/10 万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),Allegra 64R 型低温高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司),MTN-2800D 型氮吹浓缩装置(天津奥特赛恩斯仪器有限公司),SC084811 型超纯水机(四川沃特水处理设备有限公司)。

受试药材羊耳菊购自贵州龙里县,经贵州医科

大学药学院生药学教研室龙庆德副教授鉴定为菊科植物羊耳菊 *Inula cappa* 的干燥全草;取羊耳菊药材 4 kg,分别加 13, 10, 10 倍量 60% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h,合并滤液后水浴浓缩,得生药质量浓度为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓缩液,用 D101 型大孔树脂进行富集分离,用水洗脱后直接用 60% 乙醇进行洗脱,收集洗脱液,即得羊耳菊活性部位提取物^[17-18],样品溶液减压浓缩后得浸膏约 61.37 g,备用。甲苯磺丁脲、奥美拉唑、氯唑沙宗、酒石酸美托洛尔(美托洛尔)和酮康唑(大连美仑生物技术有限公司,纯度均 > 98.5%,批号分别为 J1010A, J0508A, J1115A, F0601A, 20121020),咪达唑仑注射液(江苏恩华药业股份有限公司,批号 20170502),咖啡因(美国 Sigma 公司,批号 M1082,纯度 > 98.5%),葛根素对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号 wkq16080605,纯度 > 98.5%),羧甲基纤维素钠(CMC-Na)和肝素钠(北京索莱宝公司,批号分别为 108D0213, 1024E028),二甲基亚砜(DMSO,美国 Amresco 公司,批号 302A0314),水为超纯水,甲醇和乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF 级健康雄性 SD 大鼠,体质量(200 ± 20) g,由重庆腾鑫生物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(渝)2015-0001。动物于实验前 1 周进行适应性饲养,大鼠在实验室饲养 1 周后,见一般状况正常,随即按体质量随机分组进行试验。本文所涉及的动物实验经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准,批准号 1602003。

2 方法

2.1 内标和待测物对照品溶液的配制 分别取 6 种探针药物和内标(葛根素)对照品适量,精密称定后分别用甲醇超声溶解并定容,得质量浓度约 $1.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。用甲醇稀释储备液作为不同质量浓度的工作液,并将葛根素逐级

稀释成质量浓度为 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的内标工作液。

2.2 Cocktail 探针药物的配制与给药剂量 精密称取奥美拉唑 40.0 mg , 加 DMSO $20 \mu\text{L}$ 充分溶解, 加 1,2-丙二醇 5 mL , 混匀, 得 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 奥美拉唑溶液; 精密称取咖啡因 35.0 mg , 溶于 7 mL 的生理盐水中, 得 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 咖啡因溶液; 精密称取美托洛尔 150.0 mg , 溶于 15 mL 的生理盐水中, 得 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 美托洛尔溶液; 精密称取甲苯磺丁脲 30.0 mg , 加 DMSO $15 \mu\text{L}$ 充分溶解, 加 1,2-丙二醇 5 mL , 混匀后加生理盐水 1 mL , 得 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲苯磺丁脲溶液; 精密称取氯唑沙宗 120.0 mg , 加 DMSO $15 \mu\text{L}$ 充分溶解, 加入 1,2-丙二醇 3.6 mL , 混匀后加生理盐水 2.4 mL , 混匀, 得 $20.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯唑沙宗溶液。临用前, 在离心管中加入少量 1,2-丙二醇, 再依次加入氯唑沙宗、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、咖啡因、美托洛尔溶液和咪达唑仑注射液, 混合均匀后即得工作液。上述探针药物的给药剂量分别为 $4.0, 0.5, 2.0, 1.0, 10, 2.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.3 给药方案及血样采集 大鼠随机分为 6 组, 每组 6 只。空白组给予 1% CMC-Na 溶液连续 7 d; 抑制剂组按 $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 连续给予酮康唑溶液 7 d; 7 d 和 14 d 低剂量组分别按 $2.709 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给予羊耳菊溶液; 7 d 高剂量组和 14 d 高剂量组分别按 $8.127 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给予羊耳菊溶液。以上溶液均为用 1% CMC-Na 溶液配成的混悬液, 每日灌胃给药 1 次。各组于给药结束后自由饮水禁食 12 h, 于大鼠尾静脉注射 Cocktail 探针药物, 分别于给药后 5, 10, 20, 40 min 和 1, 1.5, 2, 3, 5, 10, 12, 24, 36 h 经尾静脉取血约 0.3 mL , 并分离血浆, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

2.4 样品的前处理 将 2.3 项下的血浆样品放至室温自然融化, 加入 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内标溶液 $100 \mu\text{L}$, 涡混 3 min, 超声 5 min, 离心 ($12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min, 下同), 取上清液于 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 下氮气 (N_2) 吹干, 加 50% 甲醇 $400 \mu\text{L}$ 溶解残渣, 离心后取上清液进行 UPLC-MS 分析。

2.5 检测条件

2.5.1 UPLC 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱 ($2.1 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}, 1.7 \mu\text{m}$), 流动相 0.1% 甲酸乙腈溶液 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B) 梯度洗脱 ($0 \sim 3 \text{ min}, 10\% \sim 65\% \text{ A}; 3 \sim 3.5 \text{ min}, 65\% \sim 90\% \text{ A}; 3.5 \sim 4.5 \text{ min}, 90\% \sim 10\% \text{ A}$), 柱温 $45 \text{ }^\circ\text{C}$, 流速 $0.35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 $4 \mu\text{L}$ 。

2.5.2 MS 质谱条件 电喷雾电离源 (ESI), 选择正、负离子监测模式; 毛细管电压 3 kV , 离子源温度

$120 \text{ }^\circ\text{C}$, 去溶剂气温度 $350 \text{ }^\circ\text{C}$; 去溶剂气 N_2 , 流速 $650 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; 反吹气 N_2 , 流速 $50 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; 碰撞气为氩气, 流速 $0.35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 探针药物及内标的离子对为奥美拉唑 $m/z (+) 346.12$, 咖啡因 $m/z (+) 197.9$, 美托洛尔 $m/z (+) 268.61$, 咪达唑仑 $m/z (+) 326.2$, 甲苯磺丁脲 $m/z (-) 269.0$, 氯唑沙宗 $m/z (-) 167.7$, 葛根素 (IS) $m/z (+) 417.0$; 锥孔电压分别为 $40, 35, 20, 35, 35, 40, 40 \text{ V}$ 。

2.6 方法学考察与应用 按照美国食品药品监督管理局方法学评价指导方针^[2], 进行专属性、线性关系与检测限、回收率与基质效应、精密度和稳定性考察, 并使用该方法测定 6 种探针药物的药代动力学参数。

2.7 数据处理及统计分析 应用 DAS 2.0 软件计算 6 种探针药物的主要药代动力学参数, 利用最小二乘法拟合, 权重为 $1/C^2$, 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 采用方差分析进行多组间比较, Dunnett's T3 检验进行两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

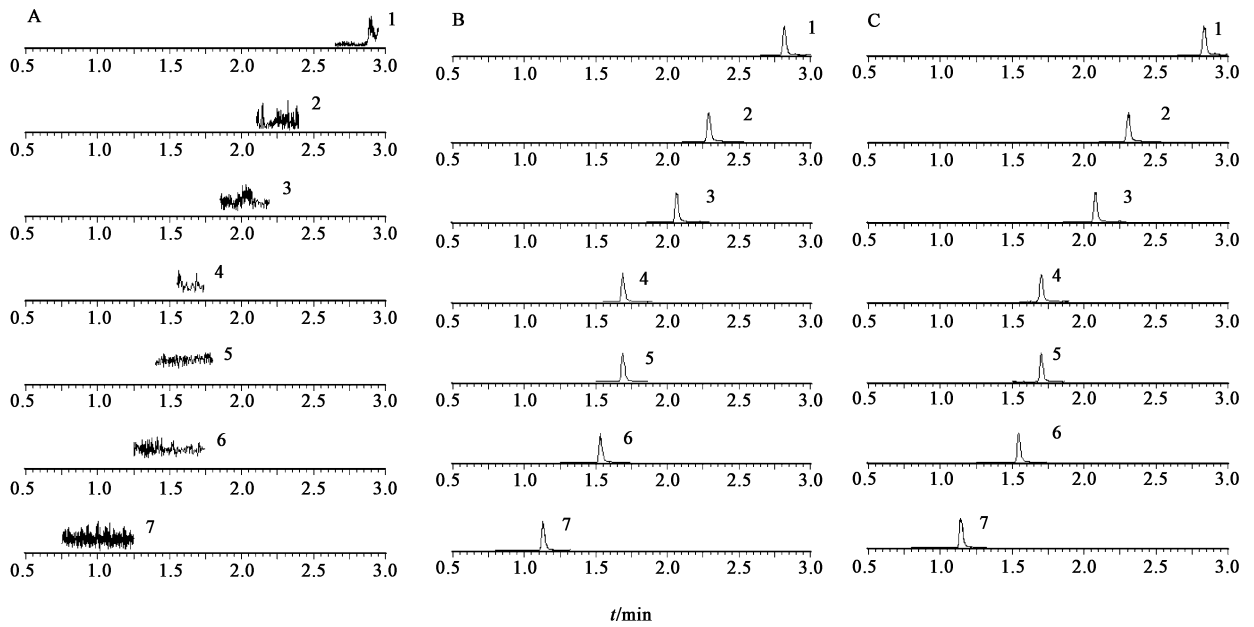
3 结果

3.1 方法学

3.1.1 专属性 按照 2.6 项下条件操作, 结果显示血浆内源性物质与待测成分互不干扰, 且待测成分具有较高的质谱响应和较好的分离度, 内标、美托洛尔、咖啡因、奥美拉唑、咪达唑仑、氯唑沙宗和甲苯磺丁脲的相对保留时间 (t_R) 分别为 1.13, 1.53, 1.69, 1.69, 2.06, 2.29, 2.82 min, 见图 1。结果表明该实验条件具有良好的专属性。

3.1.2 线性关系与检测限 以各物质质量浓度为横坐标, 待测物的峰面积与内标峰面积之比为纵坐标, 采用加权最小二乘法进行线性回归, 见表 1。结果发现大鼠血浆中 6 种探针药物的回归方程线性关系良好, 最低定量限 (LLOQ) 和最低检测限 (LLOD) 均可满足后续实验中对血浆样品的检测要求。

3.1.3 精密度、提取回收率与基质效应 取大鼠空白血浆, 按 2.4 项下方法加入低、中、高 3 个质量浓度的各探针底物, 配制质控 (QC) 样品, 每个质量浓度设 6 个平行样, 按 2.5 项下方法测定, 记录各对照峰面积 A 及内标峰面积 A_i , 连续测定 3 d, 同时测定随行标准曲线, 通过峰面积比值 A/A_i 和随行标准曲线, 计算日内和日间精密度。另取上述 QC 样品, 低、中、高 3 个质量浓度各设 6 份, 按 2.5 项下操作得样品 A; 另取大鼠空白血浆, 除不加内标和混合探针药物对照品溶液外, 其余按 2.4 项下操作, 于沉淀



A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 混合探针药物 + 内标; C. 样品; 1. 甲苯磺丁脲; 2. 氯唑沙宗; 3. 咪达唑仑; 4. 奥美拉唑; 5. 咖啡因; 6. 美托洛尔; 7. 葛根素(内标)

图 1 羊耳菊血浆样品中各探针药物的 UPLC-MS 色谱

Fig. 1 UPLC-MS chromatograms of various probe drugs in *Inula cappa* plasma samples

表 1 大鼠血浆中 6 种混合探针底物的线性回归方程

Table 1 Linear regression equations of six mixed probe drugs in rat plasma

探针底物	线性方程	R^2	线性范围/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	LLOQ/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	LLOD/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
甲苯磺丁脲	$Y = 0.0478X - 0.0037$	0.9998	0.00500 ~ 20	5.00	6.08
氯唑沙宗	$Y = 0.0487X - 0.0043$	0.9994	0.00500 ~ 20	5.00	6.17
咪达唑仑	$Y = 1.0821X - 0.0213$	0.9997	0.00375 ~ 15	3.75	0.54
奥美拉唑	$Y = 0.1276X - 0.0044$	0.9993	0.00625 ~ 25	6.25	2.06
咖啡因	$Y = 1.1172X - 0.0275$	0.9995	0.00250 ~ 10	2.50	0.53
美托洛尔	$Y = 0.1573X - 0.4128$	0.9994	0.00500 ~ 20	5.00	0.68

蛋白后的上清液中加入内标和相应质量浓度的混合探针药物对照品溶液得样品 B; 另取上述低、中、高质量浓度的混合对照品溶液与内标, 以初始流动相 400 μL 溶解得样品 C。样品 A 与样品 B 峰面积之比为提取回收率; 样品 B 与样品 C 的色谱峰面积之比为基质效应。结果 6 种探针药物在大鼠血浆中的提取回收率在 89.74% ~ 99.38%, 日内和日间精密度的 RSD 均 < 10.0%, 基质效应在 92.46% ~ 99.35%, 均符合生物样品检测要求, 且不受基质效应的干扰。见表 2。

3.1.4 稳定性考察 取 3.1.3 项下 QC 样品, 每个质量浓度 6 份样品分析, 分别于 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻放置 1 周, 反复冻融 3 次条件下, 按 2.4 项下进行样品处理, 按 2.5 项下条件测定。结果表明各成分在上述条件下峰面积的 RSD 均 < 10%, 符合规定。

3.2 药代动力学试验

3.2.1 各探针药物的药-时曲线 取 2.4 项下血浆样品按 2.5 项下操作后, 测定内标和各底物的峰面积, 根据随行标准曲线计算各时间段血药浓度, 绘制其平均药-时曲线, 见图 2。

3.2.2 各探针药物的药动学参数 各时间点的血药浓度测定结果用 DAS 2.0 软件分别按单室、二室、三室模型以最小二乘法拟合, 求得其药动学参数, 结果 6 种探针底物均符合单室模型, 权重为 $1/C^2$ 。

与空白组相比, 奥美拉唑指标下, 给药组的药时曲线下面积 AUC_{0-t} 和 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 增大, 14 d 给药组的半衰期 ($T_{1/2}$) 增大, 清除率 (CL) 降低; 甲苯磺丁脲指标下, 14 d 高剂量组的 AUC_{0-t} , $\text{AUC}_{0-\infty}$ 和 $T_{1/2}$ 增大; 咖啡因指标下, 给药组的 $T_{1/2}$ 明显增大, 14 d 给药组

表 2 各探针药物方法学考察的精密度、提取回收率与基质效应

Table 2 Precision, extraction recovery and matrix effect of methodological investigation of each probe drugs

%

待测物	质量浓度 /mg·L ⁻¹	RSD		回收率 ($\bar{x} \pm s$)	RSD	基质效应 ($\bar{x} \pm s$)	RSD	
		日内	日间					
奥美拉唑	低	0.03	5.0	3.7	92.11 ± 2.47	2.8	96.65 ± 2.45	1.7
	中	3.12	2.4	3.0	98.22 ± 1.25	2.1	97.31 ± 3.61	1.9
	高	25.00	1.5	1.2	99.12 ± 1.78	1.8	96.77 ± 2.72	2.9
咖啡因	低	0.01	5.4	7.0	91.73 ± 3.46	5.1	96.40 ± 6.37	6.6
	中	1.25	4.3	3.2	98.71 ± 1.65	2.5	98.47 ± 2.26	2.3
	高	10.00	4.8	5.5	99.38 ± 0.79	0.8	98.93 ± 1.41	1.9
美托洛尔	低	0.03	3.6	2.3	94.36 ± 6.35	7.2	92.46 ± 4.26	4.7
	中	2.50	2.5	3.6	95.82 ± 2.48	2.2	96.72 ± 1.66	1.4
	高	20.00	1.5	3.5	97.63 ± 2.23	2.7	98.35 ± 1.22	2.5
咪达唑仑	低	0.01	5.4	4.3	98.71 ± 2.16	2.9	99.35 ± 1.81	1.1
	中	1.87	4.7	3.5	97.46 ± 1.32	3.5	98.14 ± 1.32	2.4
	高	15.00	1.5	3.1	99.20 ± 1.25	1.4	95.68 ± 5.20	6.2
氯唑沙宗	低	0.03	3.4	8.7	93.38 ± 6.16	6.5	97.34 ± 4.55	4.8
	中	2.50	2.4	4.2	97.67 ± 0.31	0.3	97.74 ± 1.26	1.3
	高	20.00	1.3	3.9	98.52 ± 1.37	1.4	99.28 ± 1.67	1.0
甲苯磺丁脲	低	0.03	5.9	5.9	89.74 ± 2.86	3.3	96.77 ± 2.18	2.3
	中	2.50	3.8	5.7	97.48 ± 1.57	1.6	95.39 ± 2.87	2.3
	高	20.00	2.8	2.6	97.48 ± 3.47	1.4	98.04 ± 3.26	3.4

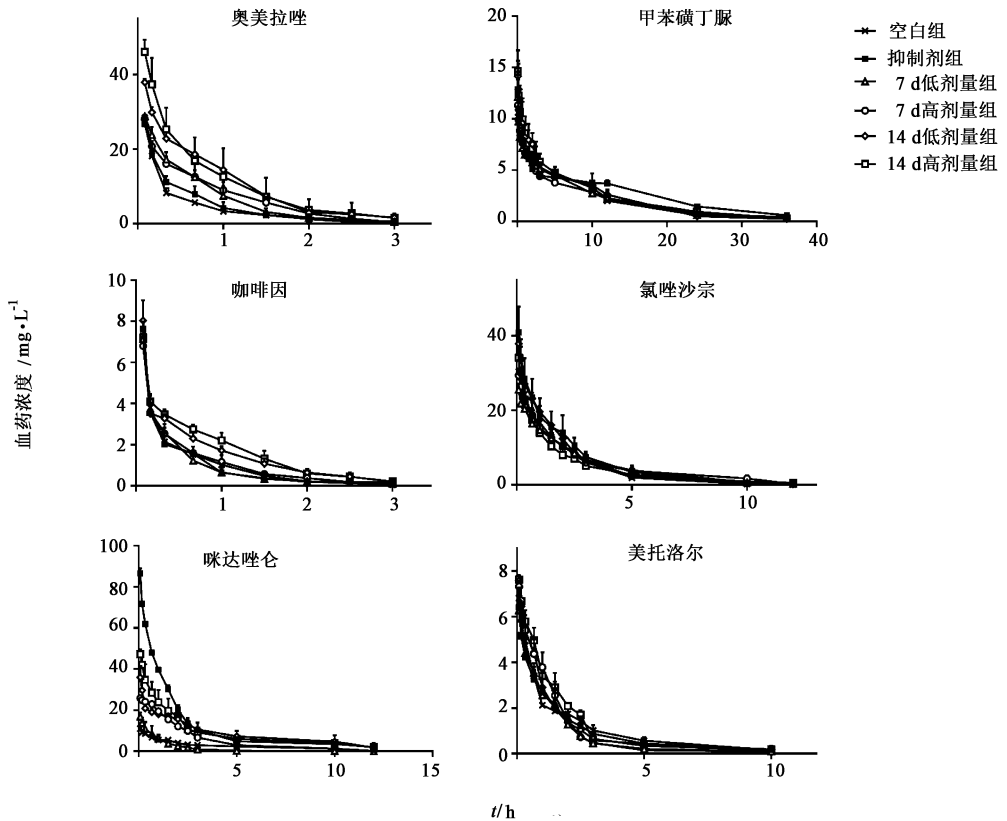


图 2 大鼠血浆中各探针药物血药浓度药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.2 Mean plasma concentration-time curves of six Cocktail probe drugs in rats plasma ($\bar{x} \pm s, n=6$)

的 AUC_{0-t} 和 $AUC_{0-\infty}$ 增大而 CL 降低;但以上 3 个指标的表观分布容积 (V) 均无明显变化。与空白组相比,咪达唑仑指标下,除 7 d 低剂量组之外,其他给

药组的 AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ 和 $T_{1/2}$ 明显增大,CL 明显降低, V 增大;氯唑沙宗和美托洛尔的药动学参数与空白组相比差异没有显著性。见表 3。

表 3 大鼠静脉注射 Cocktail 探针药物后各探针药物的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Main pharmacokinetic parameters of all Cocktail probe drugs in rats after intravenous administration ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

探针底物	参数	空白组	抑制剂组	7 d 低剂量组	7 d 高剂量组	14 d 低剂量组	14 d 高剂量组
奥美拉唑	$AUC_{0-t}/mg \cdot L^{-1} \cdot h$	15.470 ± 0.376	16.060 ± 1.823	21.178 ± 4.155 ¹⁾	23.046 ± 2.196 ¹⁾	29.362 ± 2.191 ²⁾	29.682 ± 1.312 ²⁾
	$AUC_{0-\infty}/mg \cdot L^{-1} \cdot h$	16.384 ± 1.719	16.713 ± 1.603	21.682 ± 4.417 ¹⁾	23.835 ± 2.219 ¹⁾	29.565 ± 2.345 ²⁾	29.221 ± 1.213 ²⁾
	$T_{1/2}/h$	1.370 ± 1.332	1.779 ± 1.132	1.676 ± 1.149	1.097 ± 1.215	2.138 ± 1.293 ¹⁾	4.458 ± 2.478 ²⁾
	$CL/L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	0.123 ± 0.011	0.121 ± 0.013	0.092 ± 0.021	0.081 ± 0.008	0.035 ± 0.002 ¹⁾	0.042 ± 0.008 ¹⁾
	$V/L \cdot kg^{-1}$	0.226 ± 0.185	0.325 ± 0.251	0.212 ± 0.142	0.125 ± 0.133	0.256 ± 0.057	1.282 ± 1.825
甲苯磺丁脲	$AUC_{0-t}/mg \cdot L^{-1} \cdot h$	76.247 ± 3.191	81.626 ± 6.312 ¹⁾	75.585 ± 1.900	76.228 ± 1.105	78.833 ± 1.742	87.351 ± 2.030 ¹⁾
	$AUC_{0-\infty}/mg \cdot L^{-1} \cdot h$	78.502 ± 4.245	81.997 ± 5.451 ¹⁾	79.916 ± 2.136	80.273 ± 2.339	80.613 ± 2.313	90.072 ± 1.678 ¹⁾
	$T_{1/2}/h$	6.949 ± 1.633	7.170 ± 1.259	7.556 ± 2.210	7.337 ± 2.479	7.271 ± 2.659	9.053 ± 1.084 ¹⁾
	$CL/L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	0.006 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.007 ± 0.002	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001
	$V/L \cdot kg^{-1}$	0.064 ± 0.013	0.047 ± 0.007	0.077 ± 0.014	0.087 ± 0.024	0.067 ± 0.019	0.057 ± 0.008
咖啡因	$AUC_{0-t}/mg \cdot L^{-1} \cdot h$	3.405 ± 0.202	3.211 ± 0.09	3.124 ± 0.353	3.837 ± 0.458	5.460 ± 0.360 ¹⁾	5.553 ± 0.521 ¹⁾
	$AUC_{0-\infty}/mg \cdot L^{-1} \cdot h$	3.448 ± 0.187	3.472 ± 0.319	3.267 ± 0.542	3.934 ± 0.561	5.490 ± 0.368 ¹⁾	5.706 ± 0.600 ¹⁾
	$T_{1/2}/h$	0.484 ± 0.093	0.523 ± 0.371	0.612 ± 0.405 ¹⁾	0.998 ± 0.481 ²⁾	0.659 ± 0.200 ¹⁾	0.993 ± 0.494 ²⁾
	$CL/L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	0.291 ± 0.016	0.290 ± 0.025	0.313 ± 0.047	0.258 ± 0.035	0.183 ± 0.012 ¹⁾	0.177 ± 0.019 ¹⁾
	$V/L \cdot kg^{-1}$	0.204 ± 0.046	0.334 ± 0.117	0.202 ± 0.119	0.259 ± 0.125	0.173 ± 0.053	0.247 ± 0.113
氯唑沙宗	$AUC_{0-t}/mg \cdot L^{-1} \cdot h$	60.250 ± 5.107	60.391 ± 1.748	61.955 ± 1.416	61.224 ± 3.546	60.304 ± 1.814	62.682 ± 2.714
	$AUC_{0-\infty}/mg \cdot L^{-1} \cdot h$	61.331 ± 5.124	60.611 ± 1.598	62.410 ± 1.388	62.599 ± 1.779	62.301 ± 3.504	62.832 ± 2.702
	$T_{1/2}/h$	2.685 ± 0.595	2.827 ± 0.606	2.456 ± 1.925	2.552 ± 1.216	2.136 ± 4.851	2.874 ± 1.464
	$CL/L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	0.066 ± 0.005	0.053 ± 0.008	0.061 ± 0.007	0.057 ± 0.008	0.062 ± 0.009	0.056 ± 0.002
	$V/L \cdot kg^{-1}$	1.498 ± 0.951	1.538 ± 0.488	1.472 ± 0.450	1.373 ± 0.118	1.489 ± 0.323	1.473 ± 0.123
咪达唑仑	$AUC_{0-t}/mg \cdot L^{-1} \cdot h$	40.893 ± 5.258	132.466 ± 2.115 ³⁾	40.408 ± 1.377	54.084 ± 2.957 ¹⁾	87.937 ± 1.939 ²⁾	93.451 ± 2.501 ²⁾
	$AUC_{0-\infty}/mg \cdot L^{-1} \cdot h$	41.534 ± 5.711	133.629 ± 3.366 ³⁾	40.812 ± 1.244	54.122 ± 2.995 ¹⁾	88.210 ± 1.988 ²⁾	94.376 ± 2.913 ²⁾
	$T_{1/2}/h$	1.089 ± 0.857	12.755 ± 1.377 ³⁾	1.735 ± 1.484	3.933 ± 1.311 ¹⁾	3.422 ± 0.808 ¹⁾	5.240 ± 1.523 ²⁾
	$CL/L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	0.049 ± 0.006	0.016 ± 0.004 ²⁾	0.041 ± 0.028	0.037 ± 0.002 ¹⁾	0.018 ± 0.009 ²⁾	0.016 ± 0.003 ²⁾
	$V/L \cdot kg^{-1}$	0.423 ± 0.005	1.277 ± 0.164 ³⁾	0.421 ± 1.543	0.508 ± 0.060 ¹⁾	0.581 ± 0.018 ¹⁾	0.627 ± 0.059 ²⁾
美托洛尔	$AUC_{0-t}/mg \cdot L^{-1} \cdot h$	11.546 ± 0.286	11.662 ± 0.952	11.801 ± 0.783	11.547 ± 0.961	12.053 ± 1.866	11.653 ± 1.052
	$AUC_{0-\infty}/mg \cdot L^{-1} \cdot h$	12.183 ± 1.796	12.232 ± 1.066	12.333 ± 1.458	12.139 ± 1.582	12.125 ± 1.832	11.808 ± 1.074
	$T_{1/2}/h$	2.034 ± 1.286	2.868 ± 1.872	2.193 ± 1.486	2.058 ± 0.602	2.745 ± 2.873	2.507 ± 2.098
	$CL/L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	0.842 ± 0.270	0.872 ± 0.223	0.819 ± 0.088	0.835 ± 0.106	0.841 ± 0.133	0.853 ± 0.084
	$V/L \cdot kg^{-1}$	21.578 ± 1.916	24.113 ± 1.561	20.691 ± 1.251	21.965 ± 1.034	20.593 ± 0.930	20.985 ± 2.612

注:与空白组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ 。

3.2.3 羊耳菊给药周期及剂量对探针药物药动学参数的影响 将给药组 4 组的主要药动学参数进行 2×2 析因方差分析,分析羊耳菊的给药周期及剂量对奥美拉唑、甲苯磺丁脲、咖啡因和咪达唑仑(药动学参数产生了显著性差异的 4 种探针药物)药动学

参数的影响,见表 4。

结果从给药周期来看,奥美拉唑的 AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ 和 CL 有显著性差异,甲苯磺丁脲的 $T_{1/2}$ 和 V 有显著性差异,咖啡因的 CL 有显著性差异,咪达唑仑的药动学参数均有显著性差异;从给药剂量来看,

表 4 析因设计的方差分析(2×2)

Table 4 Variance analysis of factorial design(2×2)

变异来源	探针药物	P				
		AUC _{0-t}	AUC _{0-∞}	T _{1/2}	CL	V
周期主效应	奥美拉唑	0.015	0.020	0.077	0.025	0.168
剂量主效应		0.005	0.011	0.285	0.821	0.296
周期与剂量交互效应		0.052	0.123	0.241	0.070	0.204
周期主效应	甲苯磺丁脲	0.223	0.435	0.010	0.083	0.015
剂量主效应		0.394	0.697	0.130	0.154	0.521
周期与剂量交互效应		0.335	0.213	0.127	0.146	0.126
周期主效应	咖啡因	0.145	0.151	0.407	0.015	0.250
剂量主效应		0.326	0.321	0.258	0.130	0.108
周期与剂量交互效应		0.442	0.426	0.380	0.422	0.427
周期主效应	咪达唑仑	0.010	0.014	0.039	0.012	0.013
剂量主效应		0.025	0.013	0.014	0.026	0.012
周期与剂量交互效应		0.031	0.024	0.006	0.017	0.027

奥美拉唑的 AUC_{0-t}和 AUC_{0-∞}有显著性差异,甲苯磺丁脲和咖啡因不受剂量因素的影响,咪达唑仑的药动学参数均有显著性差异;交互效应中,奥美拉唑、甲苯磺丁脲和咖啡因的主要药动学参数无交互效应,而咪达唑仑的 AUC_{0-t},AUC_{0-∞},T_{1/2},CL 和 V 均有显著性差异。

4 讨论

本研究根据文献[2],利用 Cocktail 探针药物法结合 UPLC-MS 联用技术建立了快速、同时测定大鼠血浆中甲苯磺丁脲、氯唑沙宗、咪达唑仑、咖啡因、奥美拉唑和美托洛尔 6 种 CYP450 酶的探针药物的分析方法,根据探针底物剩余量来反映大鼠体内酶活性信息。由于混合探针药物中甲苯磺丁脲和氯唑沙宗在负离子检测条件下具有较高的灵敏度,而另外 4 种探针药物在正离子检测条件下检测有较高的灵敏度,故参考文献[13,19]优化各探针药物的锥孔电压、离子源温度等参数,最终确定了本实验的质谱检测条件,进样 1 次只需 4 min,并且可以同时检测所有探针药物。

羊耳菊的临床用量为 15~30 g^[6],本研究中实验组的低剂量与文献中的高剂量保持一致,为等效剂量^[20],给药周期根据文献确定为连续 7 d 和 14 d 灌胃给药^[3,11],分组设计的剂量和周期包含了临床使用方法及药效学实验结果,全面分析了羊耳菊对大鼠 CYP450 酶的影响。结果表明羊耳菊对大鼠体内探针药物的药代动力学过程影响较为复杂。与空白组相比,在 14 d 高剂量给药时,CYP3A 的探针底

物咪达唑仑在大鼠体内的 AUC_{0-t}和 AUC_{0-∞}约增大 2.3 倍,提示羊耳菊对 CYP3A 可能存在中等抑制作用^[3,19];CYP2C19 和 CYP1A2 的探针底物奥美拉唑和咖啡因在大鼠体内的 AUC_{0-t}分别约增大 1.92 和 1.63 倍,提示羊耳菊对 CYP2C19 和 CYP1A2 可能存在弱抑制作用;CYP2C9 的探针底物甲苯磺丁脲在大鼠体内的 AUC_{0-t}和 AUC_{0-∞}增大约 1.15 倍,提示羊耳菊对 CYP2C9 可能存在微弱抑制作用。析因分析的结果说明给药周期对 CYP1A2 和 CYP2C9 抑制效应存在一定的影响,且给药周期和给药剂量对 CYP2C19 和 CYP3A 抑制效应均有影响,对 CYP3A 而言存在一定的交互效应。

根据前期对羊耳菊体外肝微粒体亚型酶活性影响的研究结果可知,与空白组相比,羊耳菊孵育给药组仅对 CYP3A 存在微弱的抑制作用,而对其他亚型酶无抑制作用,与本文结果有部分的差异,说明药物在体内的代谢是具有复杂生理机制的,仅有体外预测不足以完全说明体内情况。同时,探究羊耳菊对 CYP450 酶产生抑制作用的调控机制对羊耳菊相关制剂的临床安全用药具有重要意义,值得深入探讨。羊耳菊在临床应用较广,与化药合用情况较多,可能存在潜在的药物相互作用。本研究结果表明羊耳菊在与经 CYP3A,CYP2C9,CYP2C19 和 CYP1A2 代谢的药物联合使用时可能会抑制该酶活性,使得药物代谢减慢,甚至发生毒副作用,提示在联合用药时需要调整给药剂量,以避免由药物相互作用引起的毒副作用,为临床使用羊耳菊相关制剂提供实验依据。

[参考文献]

[1] Szalai R, Hadzsiev K, Meleg B. Cytochrome P450 drug metabolizing enzymes in roma population samples systematic review of the literature[J]. *Curr Med Chem*, 2016, 23(31):3632-3652.

[2] FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biological Evaluation and Research, et al. Guidance for industry: *in vivo* drug metabolism/drug interaction studies study design data analysis and recommendations for dosing and labeling [M]. Rockville: Federal Register, 1999.

[3] 曾苏. 药物代谢学[M]. 杭州:浙江大学出版社, 2007: 218, 368.

[4] Keller G A, Gago M L, Diez R A, et al. *In vivo* phenotyping methods: cytochrome P450 probes with emphasis on the Cocktail approach[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(14):2035-2049.

- [5] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京:科学出版社,1979:271.
- [6] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[M]. 贵阳:贵州科学技术出版社,2003:176.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:1584.
- [8] 郑黎花,郝小江,苑春茂,等. 羊耳菊化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2015,40(4):672-678.
- [9] 莫佳佳,徐慕蝶,杨丹丹,等. 侗族药羊耳菊醇提物抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(21):258-260.
- [10] 兰燕宇,郑林,黄勇,等. 甘菊滴丸的质量控制及稳定性考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(1):99-102.
- [11] 巩仔鹏,李梅,熊荻菲菲,等. 基于体内外炎症模型研究羊耳菊提取物的抗炎活性[J]. 天然产物研究与开发,2017,29(12):2050-2055.
- [12] 刘斌,沈维青,刘柏林. 抗菌药物的临床合理应用分析[J]. 中华医院感染学杂志,2014,24(11):2670-2671,2674.
- [13] 肖娟,王莹,蔡巧玲,等. Cocktail 探针药物法评价半夏泻心汤及不同配伍组对 CYP450 酶活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(4):181-186.
- [14] GENG P, WANG S, WANG C, et al. Evaluation of the impact of Flos Daturae on rat hepatic cytochrome P450 enzymes by Cocktail probe drugs [J]. Int J Clin Exp Med,2015,8(12):22310-22318.
- [15] 陈健龙,张玉玲,董宇,等. Cocktail 探针药物法评价小檗碱对肝微粒体 CYP450 酶的抑制作用[J]. 中国中药杂志,2013,38(12):2009-2014.
- [16] 杜犀,何新,黄宇虹,等. 应用 Cocktail 探针药物法分析中药对 CYP450 酶活性影响的研究进展[J]. 中国中药杂志,2016,41(24):4541-4549.
- [17] 伍萍,李梅,巩仔鹏,等. 基于在体循环肠灌注模型分析羊耳菊提取物的肠吸收特性[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(2):1-8.
- [18] 巩仔鹏,吴林霖,伍萍,等. 羊耳菊提取物在大鼠粪便中的代谢产物分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(24):100-105.
- [19] 潘洁. Cocktail 探针药物法评价艾迪注射液对 CYP450 酶活性的影响[D]. 贵阳:贵州医科大学,2017.
- [20] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学,2004,9(9):1069-1072.

[责任编辑 刘德文]