

桂枝对麻黄中麻黄碱和伪麻黄碱在小鼠脑内分布动力学的影响

曾 岑, 李 睿, 曾 勇*, 王 平, 孟宪丽

成都中医药大学, 四川 成都 611137

摘要:目的 观察桂枝对麻黄 *Ephedrae Herba* 中麻黄碱(E)、伪麻黄碱(PE)小鼠脑组织内分布动力学的影响。方法 分别 ig 给予小鼠麻黄、麻黄桂枝药对水煎液, 于不同时间点采集脑组织样本, 采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)测定脑组织中 E、PE 的经时变化, 以 Kinetica 5.0.11 软件, 对脑组织中 E、PE 进行非房室动力学拟合, 计算 E、PE 的组织动力学参数, 从而评价桂枝对麻黄中 E、PE 在脑组织内分布动力学的影响。结果 麻黄桂枝配伍组中 E、PE 脑内 t_{max} 较麻黄组延迟, $AUC_{0-\infty}$ 降低, E 的 $MRT_{0-\infty}$ 缩短。结论 桂枝配伍麻黄能通过延缓麻黄中 E、PE 在小鼠脑组织中的分布过程, 降低脑内累积分布量, 同时加快 E、PE 在脑内的消除, 从而发挥减毒作用, 证实桂枝与麻黄间存在相畏、相杀的配伍作用。

关键词: 麻黄; 桂枝; 麻黄碱; 伪麻黄碱; 组织分布

中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)11-1597-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.11.018

Effect of *Cinnamomi Ramulus* on distribution kinetics of ephedrine and pseudoephedrine from *Ephedrae Herba* in brain tissues of mice

ZENG Cen, LI Rui, ZENG Yong, WANG Ping, MENG Xian-li

Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To observe the effect of *Cinnamomi Ramulus* on the distribution kinetics of ephedrine (E) and pseudoephedrine (PE) from *Ephedrae Herba* in brain tissues of mice. **Methods** Mice were ig administered by *Cinnamomi Ramulus* and decoction of *Cinnamomi Ramulus* combined with *Ephedrae Herba*. Brain tissues of mice were collected at different time after drug administration. The variation of E and PE with time was determined by GC-MS method. The non compartmental kinetic was fitted and the parameters were calculated by Kinetica 5.0.11 software, so as to evaluate the effect of *Cinnamomi Ramulus* on the distribution kinetics of E and PE from *Ephedrae Herba* in brain tissues of mice. **Results** Compared with the *Ephedrae Herba* group, in the group with the decoction of *Cinnamomi Ramulus* combined with *Ephedrae Herba*, the t_{max} of E and PE distributed in the brain tissues of mice was delayed, the $AUC_{0-\infty}$ of E and PE in the brain tissues of mice under the drug concentration curve was smaller and the $MRT_{0-\infty}$ of E was reduced. **Conclusion** *Cinnamomi Ramulus* combined with *Ephedrae Herba* has the properties of delaying the distribution process of E and PE, reducing the cumulative distribution volume, and accelerating the elimination of E and PE in the brain tissues of mice. Above all, *Cinnamomi Ramulus* can relieve the neurotoxicity of *Ephedrae Herba*, and there is the combination function of mutual restraint and mutual suppression between the two drugs.

Key words: *Ephedrae Herba*; *Cinnamomi Ramulus*; ephedrine; pseudoephedrine; tissues distribution

麻黄 *Ephedrae Herba* 为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf、中麻黄 *Ephedra intermedia* Schrenk et C. A. Mey. 或木贼麻黄 *Ephedra equisetina* Bge. 的干燥草质茎, 麻黄具有发汗散寒、宣肺平喘、利水消肿的功效, 为临床常用解表药之一^[1]。同时, 文献统计表明, 麻黄及其生物碱类成

分在美国曾被广泛用作膳食补充剂, 具有减轻体重、增加能量的作用^[2]。但由于麻黄碱(ephedrine, E)、伪麻黄碱(pseudoephedrine, PE)具有明确的中枢兴奋作用^[3], 因此过量使用麻黄能够引起心悸、失眠、抽搐、精神失常等不良反应^[4], 这严重制约了麻黄的临床安全用药。

收稿日期: 2013-09-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81001496); 成都中医药大学科技发展基金(ZRMS201239)

作者简介: 曾 岑(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理与毒理。Tel: 18380456654 E-mail: xiaocenzi@yeah.net

*通信作者 曾 勇 Tel: 18982095682 E-mail: zengy1976@163.com

中医药在减轻药物毒性方面具有丰富经验,药对配伍是其重要手段。七情配伍理论将其概括为相畏、相杀。方剂学中,麻黄最常与桂枝 *Cinnamomi Ramulus* 配伍,传统中医理论认为桂枝有增强麻黄发汗解表之功效^[5],体现了相须为用的配伍原则。二者相须为用的配伍理论也得到了现代药理实验研究的较多证实^[6-7]。但近年来,一些药物动力学研究资料表明桂枝还能降低麻黄中 E、PE 的血药浓度^[8],这提示桂枝与麻黄的配伍关系可能不仅仅局限于相须为用,二者之间还可能存在着相畏、相杀的配伍作用。但由于目前未见二者配伍对麻黄中枢兴奋毒副作用的影响报道,因此麻黄桂枝药对配伍是否体现出不同于相须为用的其他配伍关系,还有待于进一步的研究证实。基于此设想,本实验通过比较桂枝与麻黄配伍前后小鼠脑组织中 E、PE 的动力学变化,研究桂枝对麻黄中 E、PE 在脑组织内动态分布的影响,以期从药物动力学的角度认识二者配伍的相畏、相杀作用。

1 材料

1.1 试剂与仪器

醋酸乙酯(色谱纯,天津市福晨化学试剂厂),二苯胺(IS)、氢氧化钠、磷酸氢二钠均为分析纯,七氟丁酸酐(百灵威科技有限公司),盐酸麻黄碱(批号 171241-201007)、盐酸伪麻黄碱(批号 171237-200807)均购自中国食品药品检定研究院;气相色谱-质谱联用仪(Agilent 7890A—5975C msd),离心机(上海安亭科学仪器厂),涡旋仪(上海沪西分析仪器有限公司),恒温水浴锅(北京国华医疗器械厂)。

1.2 药物

麻黄、桂枝均购于成都中药材批发市场,由成都中医药大学中药鉴定室王光志副教授鉴定为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* Stapf 的干燥草质茎和樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝。

1.3 动物

健康昆明种小鼠,雌雄各半,体质量(20±2)g,由四川省医学科学院实验动物研究所提供,动物合格证号 SCXK(川)2008-24。

2 方法

2.1 色谱/质谱条件

色谱柱:Agilent 19091s-433(30 m×250 μm, 0.25 μm);进样量 1 μL,无分流进样,进样器温度 230 °C;载气为 He;体积流量 1 mL/min;柱程序

升温:初始温度 70 °C,保持 1 min,以 20 °C/min 的速率升温至 160 °C,保持 2 min,再以 10 °C/min 的速率升温至 200 °C,保持 2 min,最后以 30 °C/min 的速率升温至 270 °C,保持 5 min;电离方式为 EI,电离电压 70 eV,倍增电压 1 400 V;选择离子监测(SIM),E 和 PE *m/z* 分别为 210.00 和 254.00,二苯胺 *m/z* 为 365.00,溶剂延迟 4.00 min。

2.2 水煎液的制备

2.2.1 麻黄水煎液 精密称取麻黄 9 g,加入 10 倍量的蒸馏水浸泡 20 min,武火煮沸,文火煎煮 50 min,纱布滤过,再加约 7 倍量的蒸馏水煎煮 25 min,合并 2 次滤液定容至每毫升药液相当于 0.05 g 麻黄生药量。其中含 E 0.022 mg/mL, PE 0.026 mg/mL。

2.2.2 桂枝麻黄合煎液 精密称取麻黄 9 g、桂枝 6 g,加入 10 倍量的蒸馏水浸泡 20 min,麻黄先煎 20 min,再加入桂枝煎煮 30 min 后,纱布滤过,后同“2.2.1”项下“麻黄水煎液”步骤。合煎液含 E 0.011 mg/mL, PE 0.010 mg/mL。

2.3 动物处理

小鼠 120 只,雌雄各半,随机分为 20 组,每组 6 只,其中 10 组分别 ig 麻黄水煎液,另 10 组分别 ig 麻黄桂枝合煎液,各组给药量(E+PE 总量)均为 0.72 mg/kg,分别于给药后 10、20、30、45、60、90、120、240、480、720 min 各处死 1 组小鼠,迅速取出脑组织,洗去表面血液并称质量,锡箔纸包裹后置于-20 °C 超低温冰箱保存。

2.4 脑组织样品预处理

按脑质量(g)与蒸馏水体积(mL)1:2 的比例制备匀浆,取匀浆液 0.5 mL 于 5 mL 离心管,加入 2 mL pH 11.73 的 NaOH-Na₂HPO₄ 缓冲液,25 μL 2 μg/mL 的 IS 溶液,再加 2 mL 醋酸乙酯(分 2 次萃取,第 1 次 1.5 mL,第 2 次 1 mL),每次涡旋震荡 2 min,3 000 r/min 离心 10 min,合并 2 次上清液后取 0.5 mL 于 1.5 mL 离心管中,氮气流吹干,加 15 μL 七氟丁酸酐与 25 μL 醋酸乙酯于上述离心管中,涡旋混合 1 min,70 °C 衍生化 30 min,氮气流吹干,加 1 mL 醋酸乙酯溶解,溶解液过 0.22 μm 滤膜待测。

2.5 标准曲线的制备方法

精密称取盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱适量,置 100 mL 量瓶,加 1 mL pH 11.73 的 NaOH-Na₂HPO₄ 缓冲液和醋酸乙酯溶解并稀释至刻度,作为对照品储备液($\rho_E=52.9 \mu\text{g/mL}$, $\rho_{PE}=59.1 \mu\text{g/mL}$)。再将

对照品储备液分别稀释成质量浓度为 10、100、150、200、300、600 ng/mL 的对照品溶液。分别取 0.1 mL 不同质量浓度的对照品溶液于 5 mL 离心管中，氮气流吹干后加入脑空白匀浆液各 0.5 mL，配成不同质量浓度的标准脑组织样品，余下步骤同“2.4”项方法进行处理。按上述色谱条件测定，分别得到 E 和 PE 的标准曲线。

3 结果

3.1 衍生化试剂及特征离子的选择

文献报道^[9]使用三氟醋酐作为衍生化试剂，本实验采用七氟丁酸酐对 E、PE 进行衍生化，衍生化后的分离度好、检测灵敏度高；本实验提取 m/z

210.00、254.00 离子质量色谱峰面积作定量，而文献报道^[9]仅选择丰度最大的碎片作特征离子，前期研究表明选取 2 个碎片较只选择 m/z 254.00 作特征离子检测灵敏度高，结合文献报道^[10]推测，E、PE 分子中的氨基衍生化为 *N,N'*-二甲基七氟丁酰胺，在 EI 电离条件下，E 和 PE 衍生物的裂解规律见图 1。

3.2 方法的专属性

空白脑组织加混合对照品 (E+PE+IS)、给药后脑组织和空白脑组织的色谱图见图 2。结果表明，空白脑组织色谱图中在对照品峰相应的保留时间处未出现色谱峰。

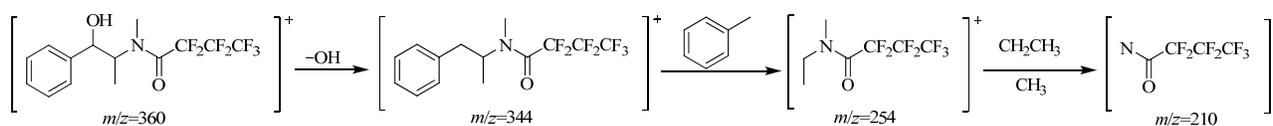


图 1 E 和 PE 衍生物的裂解规律

Fig.1 Cleavage rules of E and PE derivatives

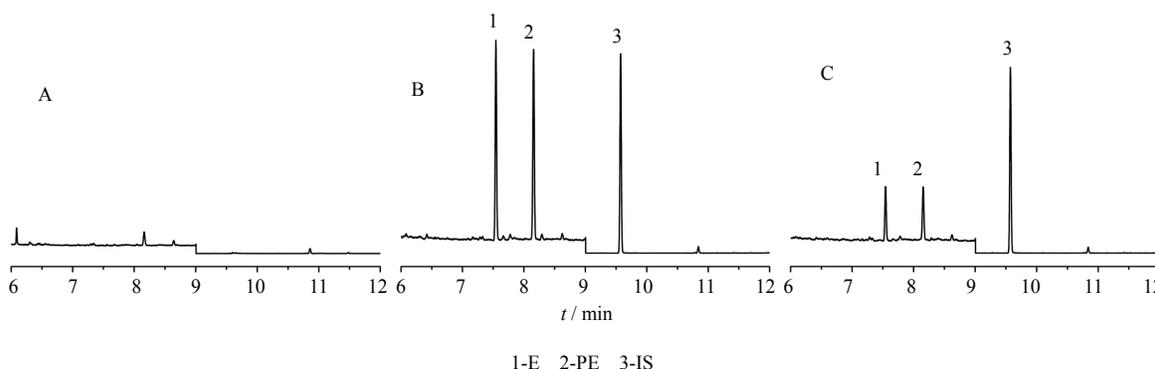


图 2 空白脑组织 (A)、空白脑组织+对照品+内标 (B) 和桂枝麻黄合煎液给药后 240 min 脑组织样品 (C) GC 图

Fig.2 GC of blank brain tissues (A), blank brain tissues + reference substance + internal standard (B), and brain tissues samples after 240 min of administration with decoction of *Cinnamomi Ramulus* combined with *Ephedrae Herba*

3.3 E 和 PE 在空白脑组织匀浆中的标准曲线

按“2.5”项下操作，以对照品与内标峰面积比值 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归，得 E、PE 在小鼠空白脑组织匀浆中的标准曲线方程。E: $Y=0.0457X-0.0165$, $r=0.9986$, 线性范围为 1.66~100 ng/mL; PE: $Y=0.0496X+0.0811$, $r=0.9953$, 线性范围为 1.66~100 ng/mL。

3.4 精密度试验

取给药后不同时间点的组织样品混合制成高、中、低 3 种质量浓度的质控样品 (样品中 E 质量浓度分别为 92.7、52.37、1.731 ng/mL, PE 质量浓度分别为 99.4、62.84、4.587 ng/mL), 每种分别取样

5 次, 连续测样 5 d, 在同日内用同一条标准曲线处理得日内精密度, 在 5 d 内用每日随行标准曲线处理得日间精密度。实验结果表明 E 的日内和日间精密度分别为 $RSD < 10.25\%$ 和 $RSD < 12.52\%$; PE 的日内和日间精密度分别为 $RSD < 9.93\%$ 和 $RSD < 11.29\%$ 。说明本方法符合生物样品精密度的要求^[11]。

3.5 回收率试验

取 0.1 mL 质量浓度分别为 0.05、0.15、0.3 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液各 5 份, 加入空白脑匀浆液 0.5 mL, 按“2.4”项下操作, 在上述色谱条件下分别测定脑组织中 E、PE 质量浓度, 与真实值比较计算回收率。结果测得 E 高、中、低 3 个质量浓度的回

收率分别为 (71.50±7.33)%、(74.80±6.88)%、(76.90±5.94)%；PE 的回收率分别为 (72.90±5.98)%、(75.30±6.28)%、(80.20±7.96)%。说明本实验方法回收率均能达到生物样品的测定要求^[11]。

3.6 脑组织中 E 和 PE 浓度经时变化

麻黄组和桂枝麻黄配伍组 E 和 PE 在小鼠脑组织的药-时曲线见图 3。

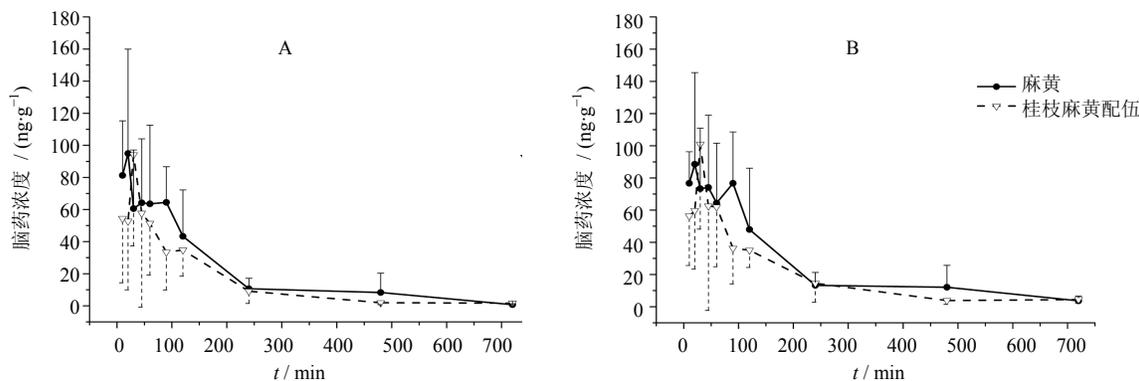


图 3 麻黄组和桂枝麻黄配伍组 E (A) 和 PE (B) 在脑组织内的药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Mean concentration-time curves of E and PE in brain tissues of mice in codecoction of *Cinnamomi Ramulus* combined with *Ephedrae Herba* ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 1 单位给药剂量下麻黄组和桂枝麻黄配伍组小鼠脑组织中 E、PE 分布动力学参数

Table 1 Distribution kinetic parameters of E and PE after administration in groups between *Ephedrae Herba* extract and codecoction of *Cinnamomi Ramulus* combined with *Ephedrae Herba*

参数	单位	E		PE	
		麻黄组	桂枝麻黄配伍组	麻黄组	桂枝麻黄配伍组
C_{max}	$ng \cdot g^{-1}$	287.68	254.32	227.04	296.90
t_{max}	h	0.33	0.50	0.33	0.50
AUC_{0-t}	$ng \cdot mL^{-1} \cdot h$	670.09	431.25	687.14	589.72
$AUC_{t-\infty}$	$ng \cdot mL^{-1} \cdot h$	5.87	13.05	34.79	49.89
$AUC_{0-\infty}$	$ng \cdot mL^{-1} \cdot h$	675.96	444.30	721.93	639.61
$t_{1/2}$	h	1.83	2.02	2.58	2.67
$MRT_{0-\infty}$	h	2.76	2.66	3.81	3.88

4 讨论

麻黄在临床应用过程中常伴有中枢不良反应，研究证实其主要成分 E、PE 易透过血脑屏障在脑组织中大量分布^[12-13]，通过升高脑内谷氨酸水平，抑制神经细胞增殖，而产生中枢神经系统毒副作用^[14-15]。因此，脑是麻黄的毒性靶器官，E、PE 的脑内浓度与麻黄的中枢兴奋副作用密切相关，可作为评价桂枝拮抗麻黄中枢毒副作用的指标，反映药对间相畏、相杀的配伍关系。

3.7 E 和 PE 脑组织分布动力学参数的计算

将小鼠脑组织中 E、PE 的浓度数据除以各小鼠给予 E 或 PE 的量，求得单位给药剂量下脑组织分布浓度，以避免两物质绝对给药量不能完全同步折算所引起的比较误差。采用 Kinetica 5.0.11 软件，对以上折算后的单位给药剂量下每克脑组织中 E、PE 的浓度数据进行统计矩分析，求算药动学参数，并比较相对生物利用度。结果见表 1。

药物的体内过程遵循吸收、分布、代谢、排泄的规律，口服的药物先经消化道吸收入血，再经血液分布到各组织器官，因此药物在体内吸收入血的过程会直接影响其在组织中的分布过程。文献报道^[16]指出，桂枝的配伍能延长小鼠血液中 E、PE 的 t_{max} ，这与本研究结果中桂枝对脑组织内 E、PE 的 t_{max} 值影响一致，提示桂枝可能通过减慢 E、PE 吸收入血的过程来延缓其在脑组织内的分布。

此外，本研究中桂枝麻黄配伍组小鼠脑内 E、

PE药-时曲线下面积(AUC_{0-∞})低于麻黄组,与文献研究^[5]体现的血液中E、PE的AUC值变化趋势一致,推测桂枝降低脑内E、PE的累积分布量与其降低血液中药物总量有关;另一方面,桂枝的配伍能降低麻黄水煎液中E、PE的溶出率^[16],使得经消化道吸收入血的药物总量和药物从血液向脑组织分布的量均降低。

同时,桂枝的配伍能缩短E的平均滞留时间(MRT_{0-∞}),而对PE的MRT_{0-∞}值无影响,说明桂枝可以缩短E在小鼠脑组织内的作用时间,使其在脑内的消除加快,提示桂枝有减轻麻黄中枢毒副作用的效果,但这一作用的具体机制尚无文献依据,还有待进一步研究证实。

整体而言,桂枝配伍麻黄后,E、PE的 t_{\max} 延长,AUC_{0-∞}降低,E的MRT_{0-∞}缩短,提示桂枝能延缓小鼠脑内E、PE的分布,降低其入脑量,加速E、PE的消除过程,从而降低麻黄的中枢毒副作用,反映了桂枝杀麻黄,麻黄畏桂枝的配伍关系。

文献报道^[9]小鼠ig麻黄水煎液后脑组织内E、PE的 t_{\max} 为2.72~2.81h,而本实验中的 t_{\max} 为0.33h,较文献报道时间缩短。其差异可能与给药量大小有关,文献中麻黄给药量约为10g/kg,大于本实验1g/kg的给药量。给药量越大,E、PE在消化道存在的时间和浓度均越大,必将延长其经消化道吸收入血和从血液分布到脑组织的时间。

综上所述,本研究采用GC-MS测定麻黄伍用桂枝前后小鼠脑组织内E、PE浓度,并求算其动力学参数,从脑组织分布动力学角度揭示了药对间相畏、相杀的配伍关系及桂枝对麻黄的减毒机制,结合体内外药理研究资料从桂枝降低水煎液中E、PE的煎出量、小鼠的血药浓度及脑内药物浓度3个方面阐释了桂枝与麻黄间相畏、相杀的配伍原则,为麻黄的合理应用提供了参考。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] Shekelle P G, Hardy M L, Morton S C, *et al.* Ephedra and ephedrine for weight loss and athletic performance [J]. *JAMA*, 2003, 289(12): 1537-1545.
- [3] 蒋袁絮, 闫琳, 余建强, 等. 麻黄碱、伪麻黄碱及其水杨酸衍生物对小鼠中枢神经系统作用的比较 [J]. 中草药, 2004, 35(11): 1274-1277.
- [4] Bowyer J F, Hopkins K J, Ferguson S A, *et al.* L-ephedrine-induced neurodegeneration in the parietal cortex and thalamus of the rat is dependent on hyperthermia and can be altered by the process of *in vivo* brain microdialysis [J]. *Toxicol Lett*, 2001, 125(1): 151-166.
- [5] 王中琳, 席加秋. 麻黄汤 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2009.
- [6] 熊倩, 张密, 郑青山. 麻黄汤不同配伍对大鼠发汗作用的定量评价 [J]. 中药临床药理学与治疗学, 2011, 27(7): 763-768.
- [7] 李春香, 丁方, 侯小双, 等. 不同配伍、煎煮及服药后时间对麻黄发汗作用的影响比较研究 [J]. 中国医药科技, 2013, 3(1): 98-99.
- [8] 沈群. 麻黄汤不同配伍对麻黄碱和伪麻黄碱在小鼠体内药代动力学的影响 [D]. 广州: 第一军医大学, 2002.
- [9] 魏凤环, 罗佳波, 沈群, 等. 麻黄汤及单味麻黄中麻黄碱与伪麻黄碱在小鼠组织中的药理学研究 [J]. 中草药, 2004, 35(7): 781-784.
- [10] Valentine J L, Middleton R. GC-MS Identification of sympathomimetic amine drugs in urine: rapid methodology applicable for emergency clinical toxicology [J]. *J Anal Toxicol*, 2000, 24(3): 211-222.
- [11] 化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则 [S]. 2005.
- [12] 魏凤环, 罗佳波, 陈育尧. 麻黄中麻黄碱在小鼠组织中的分布研究 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(5): 769-770.
- [13] 魏凤环, 罗佳波, 陈育尧. 麻黄中伪麻黄碱在小鼠组织中的分布研究 [J]. 广东微量元素科学, 2006, 13(5): 14-16.
- [14] Bowyer J F, Newport G D, Slikker W, *et al.* An evaluation of l-ephedrine neurotoxicity with respect to hyperthermia and caudate/putamen microdialysate levels of ephedrine, dopamine, serotonin, and glutamate [J]. *Toxicol Sci*, 2000, 55(1): 133-142.
- [15] Lee M K, Cheng B W H, Che C T, *et al.* Cytotoxicity assessment of ma-huang (ephedra) under different conditions of preparation [J]. *Toxicol Sci*, 2000, 56(2): 424-430.
- [16] 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.