

丹参-红花药对配伍前后对大鼠肝药酶亚型 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 活性的影响

王小平, 白吉庆, 胡锦涛, 王 金, 卫培峰, 权利娜

陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046

摘要: **目的** 研究丹参、红花药对配伍前后对大鼠肝药酶亚型 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 活性的影响。**方法** 分别选用咖啡因、氯唑沙宗和咪达唑仑作为 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 的探针药物。将大鼠随机分为 4 组, 即空白对照组、丹参 (1.2 g 生药/kg) 组、红花 (0.4 g 生药/kg) 组、丹参 (1.2 g 生药/kg) + 红花 (0.4 g 生药/kg) 组, 按上述剂量 ig 给药 7 d。于末次给药后 30 min, 尾 iv 探针药物咖啡因、氯唑沙宗和咪达唑仑溶液, 在不同的时间点取血进行检测; 以甲硝唑为内标, 采用 HPLC 法检测探针药物咖啡因、氯唑沙宗和咪达唑仑的量, 评价各药物组对大鼠 CYP3A4、CYP2E1 和 CYP1A2 活性的影响。**结果** 与空白对照组比较, 丹参组咖啡因、氯唑沙宗和咪达唑仑的清除率 (CL) 有所增强, 曲线下面积 (AUC) 减少, 其半衰期 ($t_{1/2}$) 有减少趋势, 但差异均不显著; 红花组咖啡因和氯唑沙宗的 CL 有所降低, 但差异不显著, 咪达唑仑的 CL 显著降低 ($P < 0.01$), 氯唑沙宗的 AUC 增加, 但差异不显著, 咖啡因和咪达唑仑的 AUC 明显增加 ($P < 0.05$ 、 0.01); 丹参+红花组咖啡因和氯唑沙宗的 CL 明显降低 ($P < 0.05$), 曲线下面积 (AUC) 明显增加 ($P < 0.05$), 其 $t_{1/2}$ 有延长趋势, 但差异不显著。**结论** 丹参、红花配伍后对 CYP450 亚型 CYP1A2 和 CYP2E1 有抑制作用, 这可能是丹参、红花配伍协同增效的作用机制之一。

关键词: 丹参; 红花; CYP450; CYP1A2; CYP2E1; CYP3A4

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)03-0300-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.03.003

Effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and *Carthami Flos* before and after compatibility on activities of CYP1A2, CYP2E1, and CYP3A4 from rat liver microsomes

WANG Xiao-ping, BAI Ji-qing, HU Jing-ping, WANG Jin, WEI Pei-feng, QUAN Li-na

Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: Objective To study the influence of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizome* (SMR) and *Carthami Flos* (CF) before and after compatibility on activities of cytochrome P1A2 (CYP1A2), cytochrome P2E1 (CYP2E1), and cytochrome P3A4 (CYP3A4) from rat liver microsomes. **Methods** Using caffeine, chlorzoxazone, and midazolam as the probe drugs of CYP1A2, CYP2E1, and CYP3A4, the SD rats were randomized divided into four groups: control group, SMR (1.2 g crude drug/kg) group, CF (0.4 g crude drug/kg) group, and SMR (1.2 g crude drug/kg) + CF (0.4 g crude drug/kg) group. According to the above dose, rats were ig given drugs for 7 d. Rats were injected with caffeine, chlorzoxazone, and midazolam solution in tail vein 30 min after the last administration, and the blood was collected at different time points. Metronidazole as internal standard, method has been established to determine the levels of caffeine, chlorzoxazone, and midazolam to evaluate the activities of CYP1A2, CYP2E1, and CYP3A4 by HPLC. **Results** Compared with control group, SMR increased the clearance rates (CL) of caffeine, chlorzoxazone, and midazolam, reduced the AUC, and $t_{1/2}$ was also show a decreasing trend, but the difference was not significant. In CF group, CL of caffeine and chlorzoxazone was decreased, but the difference is not significant. CL of midazolam significantly decreased ($P < 0.01$). AUC of chlorzoxazone increased, but the difference was not significant. AUC of caffeine and midazolam increased significantly ($P < 0.05$ and 0.01). In SMR + CF group, the CL of caffeine and chlorzoxazone decreased significantly ($P < 0.05$), the AUC of caffeine and

收稿日期: 2016-09-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573624); 陕西省教育厅资助项目 (2013JK0835)

作者简介: 王小平 (1976—), 女, 陕西宝鸡人, 博士后, 硕导, 研究方向为中药分析与代谢研究。Tel: 029-38185165 E-mail: wangxiaoping323@126.com

chlorzoxazone increased significantly ($P < 0.05$), and $t_{1/2}$ also showed a decreasing trend, but the difference is not significant.

Conclusion Compatibility of SMR and CF has an inhibitive effect on CYP1A2 and CYP2E1 in rats, and it could be one of the mechanisms of “interactive synergy”.

Key words: *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizome*; *Carthami Flos*; CYP1A2; CYP2E1; CYP3A4

丹参-红花是经典活血化瘀相须药对, 目前对该药对的研究仅局限于药效学和物质基础研究^[1-8], 尚未见该药对代谢相互作用的研究报道。本研究以丹参-红花药对为实验对象, 通过测定咖啡因、氯唑沙宗和咪达唑仑特异性探针药物的量来推测该药对配伍前后对肝药酶 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 的诱导或抑制作用, 评价丹参-红花药对配伍前后对大鼠 CYP450 亚酶 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 的影响, 为进一步探讨该药对协同增效的分子机制奠定基础, 为指导临床合理用药提供依据, 为阐明该药对协同增效理论提供现代科学支持。

1 材料

1.1 药材及主要试剂

丹参、红花, 来自山东菏泽步长制药有限公司, 经陕西中医药大学中药资源教研室白吉庆副教授鉴定分别为唇形科鼠尾草属丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的根及根茎、菊科红花属植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花。将丹参药材除去杂质和残茎, 洗净, 润透, 切厚片, 干燥, 即得丹参饮片。

氯唑沙宗 (批号 20130815, 质量分数 99.8%)、甲硝唑 (批号 100191-200606, 质量分数 99.5%), 均由中国食品药品检定研究院提供; 咖啡因粉 (批号 20150222, 质量分数 98.5%), 由武汉江民华泰医药化工有限公司提供; 咪达唑仑注射液 (批号 20150120, 规格 2 mg/2 mL/支, 由宜昌人福药业有限公司提供。

1.2 动物

SD 大鼠, SPF 级, 雌雄各半, 体质量 (250 ± 20) g, 由西安交通大学医学部实验动物中心提供, 动物许可证号 SCXK (陕) 2012-003。

1.3 主要仪器

戴安 Ultimate 3000 全自动高效液相色谱仪 (赛默飞世尔上海仪器有限公司, 包含 Ultimate 3000 四元梯度泵、Ultimate 3000 自动进样器、Ultimate 3000 二极管阵列检测器、chromeleon 6.8 色谱工作站); Discovery DV215CD 型双量程电子分析天平 (瑞士赛多利斯集团; 0.01 mg; 0.1 mg); EXPERT 18K-R 台式高速冷冻离心机 (长沙市鑫奥仪器仪表有限公司)。

2 方法

2.1 丹参、红花及二者混合水煎液的制备

称取丹参 200 g, 第一次加 10 倍量水, 浸泡 30 min, 煎煮 1 h, 第 2、3 次均加 8 倍量水, 每次提取 1 h, 提取液合并, 减压浓缩至含生药量 1 g/mL; 红花水煎液制备方法及药物浓度同丹参水煎液; 丹参-红花混合煎液按临床剂量比例 3:1 称取丹参 300 g、红花 100 g 混合, 制备方法及药物浓度同丹参水煎液。4 °C 冰箱保存备用, 临用前按剂量配制所需浓度。

2.2 溶液的配制

2.2.1 探针溶液的配制 分别精密称取咖啡因和氯唑沙宗各 50 mg, 取咪达唑仑注射液 (2 mg/支) 25 支, 加入少量聚山梨酯 80 研磨, 加生理盐水定容到 25 mL, 摇匀, 用于大鼠尾 iv; 分别精密称取咖啡因、氯唑沙宗和咪达唑仑 0.2、0.3 和 0.1 mg, 置 100 mL 的量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 用于方法学考察。

2.2.2 内标溶液的配制 精密称取甲硝唑 10 mg, 置于 25 mL 的量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 即得。

2.3 大鼠分组及给药

雄性 SD 大鼠随机分为 4 组: 空白对照组 (等体积水)、丹参组 (1.2 g 生药/kg 丹参水煎液)、红花组 (0.4 g 生药/kg 红花水煎液)、丹参+红花组 (1.2 g 生药/kg 丹参水煎液+0.4 g 生药/kg 红花水煎液), 每组 6 只。大鼠给药剂量参考中国药典规定的人口服剂量, 根据人和大鼠体表面积比例进行换算。给药前大鼠禁食 12 h, 每日 ig 给药 1 次 (体积 2.0 mL), 连续 7 d。于末次给药后 30 min, 尾 iv 探针药物溶液, 给药体积 5 mL/kg^[9]。

于给予探针药物后 5、10、20、30、60、90、120、150、180、300、480、720 min 乙醚麻醉, 眼底静脉丛取血 0.5 mL, 置肝素钠处理过的离心管中, 冰浴中放置 30 min, 0 °C、5 000 r/min 离心 10 min, 分取血浆, -80 °C 保存备用。取血期间大鼠禁食不禁水。

2.4 样品前处理方法

取 “2.3” 项下的血浆 100 μL, 置 1.5 mL EP 管

中,精密加入内标溶液(甲硝唑,质量浓度 0.4 mg/mL) 10 μ L,漩涡混合 1 min;精密加入 20%盐酸溶液 50 μ L,漩涡混合 1 min;再加入醋酸乙酯 1 mL,漩涡混合 1 min;0 $^{\circ}$ C,10 000 r/min 离心 10 min,分取上清液,于 25 $^{\circ}$ C 水浴中氮气吹干,残渣精密加入流动相 100 μ L,漩涡 1 min,过 0.22 μ m 的微孔滤膜,即得。

2.5 色谱条件

HYPURITY C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m);甲醇(A)-0.2%磷酸水(B)为流动相,梯度洗脱:0~10 min,45%~50% A;10~15 min,50%~55% A;15~20 min,55%~60% A;20~25 min,60% A;25~30 min,60%~45% A;检测波长 230 nm;体积流量 1 mL/min;柱温 35 $^{\circ}$ C;进样体积 20 μ L。

2.6 方法学考察

2.6.1 专属性考察 取空白血浆 100 μ L、空白血浆+探针药物+内标(咖啡因的质量浓度为 3.2 μ g/mL;氯唑沙宗的质量浓度为 4.8 μ g/mL;咪达唑仑的质量浓度为 1.6 μ g/mL)、注射探针药物 10 min 后的血浆+内标,按照“2.4”项方法处理,在“2.5”项色谱条件下进样,考察方法专属性。

2.6.2 线性关系考察 精密取空白血浆 100 μ L,置 1.5 mL EP 管中,分别精密加入各探针药物溶液、内标溶液 10 μ L,漩涡混匀 1 min,其余按照“2.4”项下方法操作,制备系列质量浓度的血浆探针药物溶液(咖啡因的质量浓度为 0.8、1.6、3.2、6.4、12.8、25.6、51.2 μ g/mL;氯唑沙宗的质量浓度为 1.2、2.4、4.8、9.6、19.2、38.4、76.8 μ g/mL;咪达唑仑的质量浓度为 0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8、25.6 μ g/mL),每个质量浓度平行制备 3 份,按“2.5”项下的色谱条件测定。记录各对照品和内标的峰面积,以对照品质量浓度(X)与对照品和内标峰面积比值(Y)作线性回归,得标准曲线方程。

2.6.3 最低定量限试验 在空白血浆中精密加入一定量的混合探针药物溶液适量,混匀,逐步稀释,以探针药物峰信号与噪音信号比 10:1 为最低定量质量浓度,重复测定 3 次。

2.6.4 精密度、准确度试验 取空白血浆 100 μ L,置 1.5 mL EP 管中,分别精密加入各探针药物溶液、内标溶液 10 μ L,漩涡混匀 1 min,其余按照“2.4”项下方法操作,制备不同质量浓度的血浆探针物质质控样品(咖啡因的质量浓度为 0.8、3.2、12.8 μ g/mL;

氯唑沙宗的质量浓度为 1.2、4.8、19.2 μ g/mL;咪达唑仑的质量浓度为 0.4、1.6、6.4 μ g/mL),按“2.5”项下色谱条件检测,同 1 天内不同质量浓度各平行测定 5 次,计算日内精密度(RSD);对上述各浓度连续检测 5 d,计算日间精密度(RSD);与制备的探针药物质量浓度对比,计算准确度。

2.6.5 稳定性试验 按“2.6.3”项下方法制备高、中、低质量浓度的血浆质控样品,每个质量浓度平行制备 5 份样品。将高、中、低 3 个质量浓度的血浆样品于常温下保存 12 h、4 $^{\circ}$ C 下保存 24 h,每 4 小时测定 1 次;在冻融-冷冻循环试验中,将质控样品置于 4 $^{\circ}$ C 下保存 24 h,取出后于室温下自然融解,再置于 4 $^{\circ}$ C 下 24 h,如此冻融-冷冻循环 2 次后测定;长期稳定性试验中,将质控样品于-60 $^{\circ}$ C 保存 15 d 进行测定。

2.6.6 绝对回收率试验 按“2.6.3”项下方法制备高、中、低质量浓度的血浆质控样品,按照“2.5”项下色谱条件,连续进样 6 次,记录峰面积,计算质控样品的峰面积与内标峰面积之比(A)、未经处理的相应质量浓度的探针药物溶液的峰面积与内标峰面积之比(B),以 A/B 计算绝对回收率。

2.6.7 基质效应试验 取空白血浆 100 μ L,按照“2.4”项下方法操作,残渣精密加入流动相溶解后,加入血浆探针药物,使咖啡因的质量浓度为 0.8、3.2、12.8 μ g/mL;氯唑沙宗的质量浓度为 1.2、4.8、19.2 μ g/mL;咪达唑仑的质量浓度为 0.4、1.6、6.4 μ g/mL,过 0.22 μ m 的微孔滤膜。照“2.5”项下色谱条件,连续进样 6 次,记录峰面积,计算其与内标峰面积的比值(C);记录未经处理的相应质量浓度的探针药物溶液的峰面积,计算其与内标峰面积的比值(B);以 C/B 计算基质效应。

2.6.8 重复性试验 按“2.6.4”项下方法制备高、中、低质量浓度的血浆质控样品各 6 份,按照“2.5”项下色谱条件测定,记录峰面积,代入标准曲线方程,计算 RSD。

2.7 血浆中探针药物的测定

取“2.3”项下的大鼠血浆 100 μ L,按照“2.4”项下的方法处理,按照上述建立的 HPLC 测定方法进行测定。

2.8 药动学参数计算及分析方法

药动学参数采用 DAS 3.0 软件计算。各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 方法专属性考察

按照“2.5”项下的色谱条件, 探针药物咖啡因、

氯唑沙宗、咪达唑仑和内标物甲硝唑分离度好, 相应位置无干扰, 可以用于咖啡因、氯唑沙宗和咪达唑仑的血药浓度测定, 结果见图1。

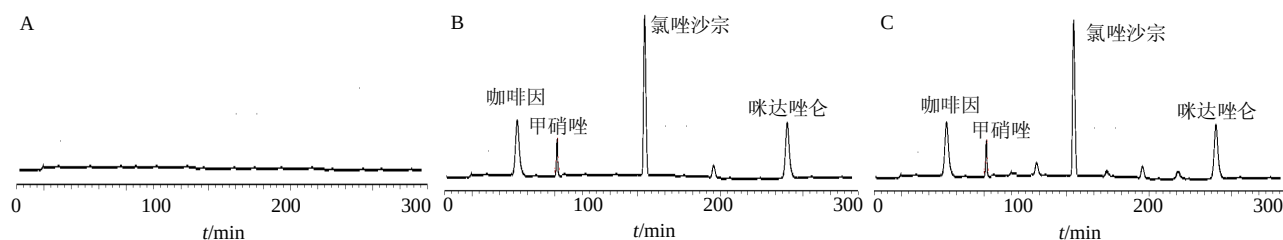


图1 空白血浆 (A)、空白血浆+探针药物+内标 (B) 和 ig 探针药物 10 min 后血浆样品+内标 (C) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of blank plasma (A), blank plasma + probe drugs + internal standard (B), and plasma sample of 10 min after ig administration of probe drugs + internal standard (C)

3.2 线性关系的考察

以探针药物的质量浓度为横坐标, 以探针药物和内标物的峰面积比为纵坐标, 进行线性回归, 回归方程: $Y_{\text{咖啡因}} = 0.8679X - 0.1389$, $r = 0.9967$; $Y_{\text{氯唑沙宗}} = 0.2678X - 0.1586$, $r = 0.9954$; $Y_{\text{咪达唑仑}} = 0.1489X - 0.1286$, $r = 0.9914$ 。即咖啡因在 $0.8 \sim 51.2 \mu\text{g/mL}$, 氯唑沙宗在 $1.2 \sim 76.8 \mu\text{g/mL}$, 咪达唑仑在 $0.4 \mu\text{g/mL} \sim 25.6 \mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

3.3 最低定量限试验

咖啡因、氯唑沙宗、咪达唑仑最低定量限分别为 0.8 、 3.0 、 $0.15 \mu\text{g/mL}$ 。

3.4 精密度、准确度试验结果

3 个不同质量浓度的咖啡因、氯唑沙宗、咪达唑仑精密度良好, RSD 均小于 10.0% ; 准确度介于 $90\% \sim 100.47\%$, 均符合生物样品分析的要求, 结果见表1。

表1 3种探针药物的精密度试验结果

Table 1 Intra- and inter-day precision data for three kinds of probe drugs

成分	浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	日内			日间		
		测定浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	准确度/%	精密度RSD/%	测定浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	准确度/%	精密度RSD/%
咖啡因	0.8	0.73 ± 0.06	91.25	6.87	0.72 ± 0.06	90.00	8.29
	3.2	2.96 ± 0.21	92.50	7.10	2.95 ± 0.28	92.19	9.49
	12.8	12.86 ± 0.36	100.47	7.40	11.85 ± 0.37	92.58	7.63
氯唑沙宗	1.2	1.19 ± 0.14	99.17	5.34	1.15 ± 0.16	95.83	6.03
	4.8	4.45 ± 0.35	92.71	3.08	4.41 ± 0.55	91.88	4.80
	19.2	18.58 ± 1.55	96.77	8.87	18.38 ± 1.75	95.73	9.90
咪达唑仑	0.4	0.38 ± 0.01	95.00	8.24	0.37 ± 0.01	92.50	7.91
	1.6	1.47 ± 0.03	91.88	6.52	1.45 ± 0.02	90.63	4.44
	6.4	6.06 ± 0.05	94.69	5.82	5.85 ± 0.06	91.41	7.04

3.5 稳定性试验

高、中、低3个质量浓度的血浆样品于常温下保存12 h, 4°C 下保存24 h, 咖啡因高、中、低质量浓度的RSD分别为2.9%、3.6%、5.5%; 氯唑沙宗高、中、低质量浓度的RSD分别为2.7%、3.2%、4.8%; 咪达唑仑高、中、低质量浓度的RSD分别为3.8%、6.9%、9.5%。

在冻融-冷冻循环试验中, 咖啡因高、中、低质量浓度的RSD分别为7.1%、4.8%、8.7%; 氯唑

沙宗、中、低质量浓度的RSD分别为8.7%、9.2%、9.9%; 咪达唑仑高、中、低质量浓度的RSD分别为6.4%、6.8%、7.6%。

长期稳定性试验中, 咖啡因高、中、低质量浓度的RSD分别为9.3%、8.4%、9.8%; 氯唑沙宗高、中、低质量浓度的RSD分别为9.2%、8.9%、8.7%; 咪达唑仑高、中、低质量浓度的RSD分别为8.3%、9.5%、7.5%。表明样品可以在常温下保存12 h, 4°C 下冻融-冷冻循环至少2次、 -60°C 保存15 d, 探

针药物质量浓度无明显变化,基本稳定。

3.6 绝对回收率、基质效应试验结果

3个不同质量浓度的咖啡因、氯唑沙宗和咪达唑仑和内标物甲硝唑的提取回收率均介于61.2%~

72.8%,RSD均小于8.0%,符合生物样品分析的要求;基质效应均介于89.4%~99.8%,表明本方法可有效地避免基质对各探针药物测定的影响。结果见表2。

表2 3种探针药物和内标物的绝对回收率

Table 2 Absolute recoveries for three kinds of probe drugs and IS

成分	浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	绝对回收率			基质效应		
		回收率/%	标准偏差/%	RSD/%	回收率/%	标准偏差/%	RSD/%
咖啡因	0.8	61.2	3.28	3.60	94.6	3.22	3.40
	3.2	72.8	3.15	3.41	95.4	3.13	3.28
	12.8	71.3	2.18	2.15	99.8	2.21	2.21
氯唑沙宗	1.2	64.7	5.78	6.61	97.3	2.97	3.05
	4.8	69.4	2.47	2.61	94.9	2.35	2.48
	19.2	72.5	3.23	3.33	99.7	2.79	2.80
咪达唑仑	0.4	61.2	5.92	7.32	89.4	3.29	3.68
	1.6	68.4	5.12	5.57	92.8	3.52	3.79
	6.4	70.5	4.31	4.52	95.3	3.35	3.52

3.7 重复性试验结果

咖啡因高、中、低质量浓度的RSD分别为4.33%、2.96%、4.34%;氯唑沙宗高、中、低质量浓度的RSD分别为3.65%、2.65%、4.24%;咪达唑仑高、中、低质量浓度的RSD分别为2.71%、2.65%、4.92%,符合生物样品分析要求。

3.8 血浆中探针药物的测定

各实验组大鼠尾iv给予探针药物,在不同时间点取血测定其探针药物在大鼠体内的浓度。以时间为横坐标,探针药物血药浓度为纵坐标,绘制药时曲线。结果见图2。

3.9 药动学参数测定

将3种探针药物血药浓度数据分别经药动学计算,结果见3~5。与空白对照组比较,连续ig

相应的药物7d后,丹参组咖啡因、氯唑沙宗和咪达唑仑的清除率(CL)有所增强,曲线下面积(AUC)减少,其半衰期($t_{1/2}$)有减少趋势,但差异无统计学意义。

红花组咖啡因和氯唑沙宗的CL有所降低,但差异不显著,咪达唑仑的CL显著降低($P<0.01$);氯唑沙宗的AUC增加,其 $t_{1/2}$ 有延长趋势,但差异无统计学意义;咖啡因和咪达唑仑的AUC明显增加($P<0.05$ 、0.01)。

丹参+红花组咖啡因和氯唑沙宗的CL明显降低($P<0.05$),AUC明显增加($P<0.05$ 、0.01),其 $t_{1/2}$ 有延长趋势,但差异无统计学意义;咪达唑仑的清除率(CL)有所降低,曲线下面积(AUC)增加,其 $t_{1/2}$ 有减少趋势,但差异无统计学意义。

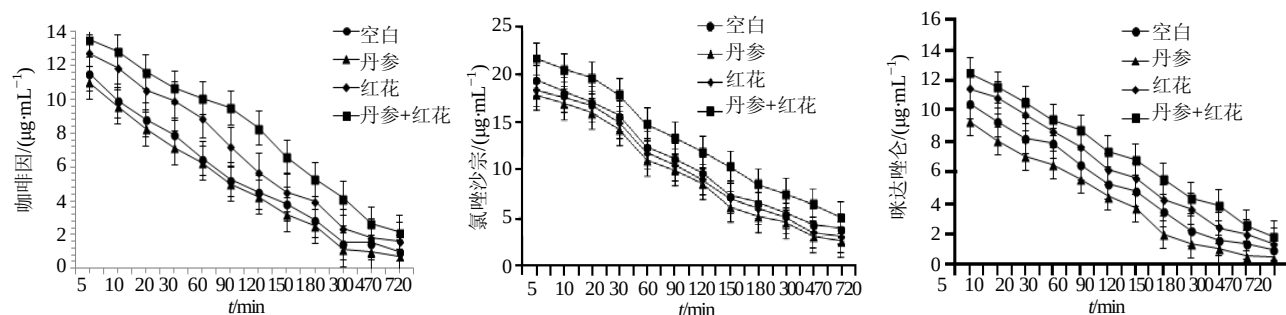


图2 咖啡因、氯唑沙宗、咪达唑仑的药时曲线($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Cocentration-time curves of caffeine, chlorzoxazone, and midazolam ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表3 咖啡因主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 3 Pharmacokinetic parameters of caffeine ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	空白对照	丹参	红花	丹参+红花
$t_{1/2}$	h	1.83±0.84	1.63±0.81	1.89±0.93	1.93±0.94
CL	L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	0.32±0.03	0.38±0.09	0.28±0.11	0.25±0.02*
V_z	L·kg ⁻¹	0.79±0.17	0.82±0.14	0.65±0.18	0.49±0.19
AUC	mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹	32.34±0.48	31.15±0.68	59.32±0.84**	62.32±1.08**

与空白对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs black control group表4 氯唑沙宗主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 4 Pharmacokinetic parameters of chlorzoxazone ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	空白对照	丹参	红花	丹参+红花
$t_{1/2}$	h	0.58±1.14	0.54±0.78	0.65±1.04	0.82±1.12
Cl	L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	0.57±0.05	0.55±0.03	0.41±0.11	0.32±0.04*
V_z	L·kg ⁻¹	1.89±0.52	1.95±0.59	1.68±0.47	1.32±0.56
AUC	mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹	22.66±2.52	21.61±5.69	26.65±7.69	32.17±7.69*

与空白对照组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs black control group表5 咪达唑仑主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 5 Pharmacokinetic parameters of midazolam ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	空白对照	丹参	红花	丹参+红花
$t_{1/2}$	h	0.48±0.34	0.28±0.32	0.56±0.65	0.79±0.56
Cl	L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	8.75±1.21	8.95±1.25	6.25±1.25**	7.65±1.31
V_z	L·kg ⁻¹	2.53±0.89	2.85±0.96	2.13±0.87	2.35±0.85
AUC	mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹	0.61±0.08	0.51±0.35	0.93±0.05*	0.78±0.65

与空白对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs black control group

4 讨论

临床上药物合用的现象越来越普遍, 药物之间的相互作用成为研究的热点^[10-11]。肝药酶是动物体内一种重要的代谢酶, 进入血液循环的药物基本上是经肝药酶代谢的, 所以对肝药酶有影响的药物, 也会影响到药物的代谢。本研究选用主要经 CYP1A2 代谢的药物咖啡因, 主要经 CYP2E1 代谢的药物氯唑沙宗, 和主要经 CYP3A4 代谢的药物咪达唑仑为探针药物, 通过这些探针药物原型在体内的量来反应肝药酶的活性。

肝药酶 CYP450 是肝代谢的主要酶系, 其中与药物代谢密切相关的同工酶主要有 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 等, 其中咖啡因主要经过肝药酶 CYP1A2 代谢, 氯唑沙宗主要经过肝药酶 CYP2E1 代谢, 咪达唑仑主要经过肝药酶 CYP3A4 代谢, 因此, 本实验选择上述三种药物作为探针药

物, 建立了 HPLC 法同时测定血浆中 3 种探针药物咖啡因、氯唑沙宗和咪达唑仑含量的方法, 通过观察丹参、红花配伍前后对上述三种探针药物代谢的影响, 评价丹参、红花配伍前后是否具有诱导或抑制肝药酶 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 的作用。实验结果表明, 与空白对照组比较, 连续 ig 丹参+红花 7 d 后, 咖啡因和氯唑沙宗的 CL 明显降低 ($P < 0.05$), AUC 明显增加 ($P < 0.05$), 其 $t_{1/2}$ 有延长趋势, 差异有统计学意义。提示, 丹参、红花配伍后对 CYP450 亚型 CYP1A2 和 CYP2E1 有抑制作用, 能够延缓主要经 CYP1A2 和 CYP2E1 代谢的药物的 $t_{1/2}$, 这可能是丹参、红花配伍增效的作用机制之一。

由于丹参、红花配伍后对 CYP450 亚型 CYP1A2 和 CYP2E1 有抑制作用, 因此, 当临床上丹参-红花药对与 CYP1A2 和 CYP2E1 酶的底物药物合用时, 应注意可能由于药物相互之间的作用使该底物体内

血药浓度过高而的产生不良反应。由于本实验只初步表明丹参、红花配伍后对 CYP450 亚型 CYP1A2 和 CYP2E1 有抑制作用,该结果需要进一步论证。同时,大鼠和人类 CYP450 酶基因的核苷酸序列不尽相同,所表达的各亚型酶有可能不完全一致,因此,丹参、红花配伍对人体内 CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 及对其他亚型 CYP450 酶的影响有待深入研究。

$t_{1/2}$ 、CL、 V_z 、AUC 这些参数是从药物动力学的角度来谈的,它们的改变只能说明两种药物之间产生了相互作用,比如后一种药物可以竞争前一种药物的转运载体或竞争参与它反应(代谢)的酶,以至于影响了前一种药物的吸收、分布、代谢和排泄。它并不能直接说明对药效的结果产生怎样影响。具体药效增强与否还需要考察药效-药动之间的关系。

参考文献

- [1] 杨文潮,王小平,白吉庆.丹参-红花配伍比例对血瘀证大鼠血流变学和血流动力学的影响[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2015,43(12):35-40.
- [2] 王小平,刘峰,杨东华.HPLC-MS 测定大鼠注射丹红注射液后血浆中3种酚酸类成分[J].中草药,2012,43(2):275-278.
- [3] 王小平,刘峰,杨东华.HPLC 测定丹红注射液中迷迭香酸在大鼠血浆中的浓度[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):220-222.
- [4] 王小平,白吉庆,杨东华.丹红注射液中迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 在大鼠血浆中的浓度测定[J].中国新药杂志,2011,20(24):88-91.
- [5] 王小平,刘峰,翰翠.丹参、红花不同提取工艺对酚酸类化学成分的影响[J].贵阳中医学院学报,2011,33(6):154-155.
- [6] 王小平,刘峰,翰翠.丹参、红花分提和合提提取液的指纹图谱比较[J].云南中医学院学报,2011,34(4):11-13.
- [7] 刘剑刚,张大武,李婕,等.丹参、红花水溶性组分及配伍对大鼠心肌缺血/再灌注损伤作用的实验研究[J].中国中药杂志,2011,36(2):189-194.
- [8] 高丽娜,崔元璐,延阔,等.丹参红花配伍研究进展[J].中草药,2016,47(4):671-679.
- [9] 郭沛鑫,李奕融,郑进,等.Cocktail 探针药物法评价百解胶囊对肝药酶亚型 CYP2C19、CYP2E1 的影响[J].中药药理与临床,2015;31(4):163-166.
- [10] 成龙,王岚,王彦礼,等.金铃子散不同配比方对大鼠肝药酶 CYP1A2 活性的影响[J].中国中药杂志,2012,37(5):648-653.
- [11] 武洁,沈红,钟荣玲,等.探针药物法评价大鼠体内甘草配伍大戟、甘遂和芫花对细胞色素 CYP1A2 活性的影响[J].中国医院药学杂志,2014,34(20):1721-1725.