

能诱导巨噬细胞从头合成 NO^[9]。本研究结果显示, RNA 转录抑制剂放线菌素 D 蛋白质合成抑制剂放线菌酮和 NOS 竞争性抑制剂 L-NMA, 均能有效抑制 LTN 所诱导的巨噬细胞 NO 生成和细胞内 GSH 的减少。另一方面, 使用 GSH 去除剂 BSO BrO 和 ETA 亦能减少 LTN 所诱导的巨噬细胞 NO 生成。提示在 LTN 激活巨噬细胞过程中, 细胞内 GSH 可能起到调节巨噬细胞 NO 合成及保护宿主细胞免受 NO 介导的细胞毒作用。

参考文献:

- [1] Irimoda K, Masihi K N, Chhara G. Stimulation of microbicidal host defence mechanism against aerosol influenza virus infection by Lentinan [J]. Int J Immunopharmacol, 1992, 14: 971-977.
- [2] 黄迪南, 侯 敢, 祝其锋. 香菇多糖对小鼠腹腔巨噬细胞一氧化氮生成的影响及其机理 [J]. 基础医学与临床, 1999, 19(3): 260-262.
- [3] Ding A H, Nathan C F, Stuehr D J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages [J]. J Immunol, 1988, 141(7): 2407-2412.

- [4] Ghigo D, Alessio P, Foco A. *et al.* Nitric oxide synthesis is impaired in glutathione-depleted human umbilical vein endothelial cells [J]. Am J Physiol, 1993, 265(3pt1): C728-732.
- [5] Loshach R B, Russel S W. A specific sequence of stimulation is required to induce synthesis of the antimicrobial molecule nitric oxide by mouse macrophage [J]. Infect Immunol, 1992, 60(5): 2133-2135.
- [6] John S H, Fernando Q C, Guy H N, *et al.* Induction of nitric oxide synthesis in J774 cells lowers intracellular glutathione: effect of modulated glutathione redox status on nitric oxide synthase induction [J]. Biochem J, 1997, 322: 477-481.
- [7] Zamora R, Matthys K E, Herman A G. The protective role of thiols against nitric oxide-mediated cytotoxicity in murine macrophage J774 cells [J]. Eur J Pharmacol, 1997, 321(1): 87-96.
- [8] Romao P R, Fonseca S G, Hothersall J S, *et al.* Glutathione protects macrophages and leishmania major against nitric oxide-mediated cytotoxicity [J]. Parasitology, 1999, 118(pt6): 559-566.
- [9] Weisz A, Oquchi S, Cicatillo L, *et al.* Dual mechanism for the control of inducible-type NO synthase gene expression in macrophages during activation by interferon- γ and lipopolysaccharide [J]. J Biol Chem, 1994, 269(11): 8324-8333.

小儿抗痫胶囊中 α -细辛醚的药物动力学研究

张德芹¹, 马 融², 刘昌孝³, 戚爱棣^{1*}

(1. 天津中医学院 中药系, 天津 300193; 2 天津中医学院第一附属医院, 天津 300193; 3. 天津药物研究院, 天津 300193)

摘要: 目的 测定小儿抗痫胶囊中主要有效成分 α -细辛醚在大鼠体内的血药浓度, 并根据血药浓度-时间配对资料测算其体内药代动力学参数。方法 采用 HPLC 测定 ig 给药 1.25, 2.5, 5 g/kg 不同剂量小儿抗痫胶囊后, 大鼠体内 α -细辛醚的血药浓度。血药浓度数据采用 3P97 药代动力学软件进行参数模拟。结果 小儿抗痫胶囊中有效成分 α -细辛醚在大鼠体内的动力学过程可用一级动力学过程的一室开放型模型来描述。低、中、高 3 个不同剂量组高峰血药浓度 (C_{max}) 分别为 0.46, 0.83, 1.33 μ g/mL, 达峰时间 (T_{peak}) 分别为 81.94, 88.85 和 96.12 min, 血药浓度-时间曲线下面积 (AUC) 分别为 152.75, 225.16 和 393.21 μ g $\cdot$ min/mL。结论 本研究建立的 HPLC 测定大鼠 ig 不同剂量小儿抗痫胶囊后 α -细辛醚血药浓度的实验方法简便、快速、灵敏, 血浆中内源性物质及复方各组分药物不干扰测定。该研究可为小儿抗痫胶囊在临床和量化研究提供可靠的依据。

关键词: HPLC; 小儿抗痫胶囊; α -细辛醚; 药代动力学

中图分类号: R285.61 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)03-0247-04

Pharmacokinetics study of α -asarone in XIAOER KANGXIAN CAPSULE*

ZHANG De-qin¹, MA Rong², LIU Chang-xiao³, QI Ai-di¹

(1. Department of Chinese Materia Medica, Tianjin College of TCM, Tianjin 300193, China; 2. First Affiliated Hospital of Tianjin College of TCM, Tianjin 300193, China; 3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Key words HPLC; XIAOER KANGXIAN CAPSULE; α -asarone; pharmacokinetics

* XIAOER KANGXIAN CAPSULE is a Chinese herbal preparation with *Rhizoma Acori Tatarinowii*, *Rhizoma Gastrodiae*, etc.. It is used against epilepsy and convulsion of children.

收稿日期: 2001-07-17

基金项目: 天津市卫生局中医、中西医结合科研基金资助课题 (200042)

作者简介: 张德芹 (1963-), 女 (满族), 硕士, 天津中医学院中药系副教授, 主要从事中药学教学及中草药药代动力学研究工作, 参编医著 4 部, 在国内公开刊物发表论著 12 篇

小儿抗痫胶囊是著名儿科专家李少川教授的验方,系由石菖蒲、天麻等药物经加工制成的中成药,具有益气安神、豁痰镇惊之功效,可用于小儿癫痫及惊风抽搐^[1]。其中石菖蒲为方中主药, α -细辛醚为石菖蒲的主要有效成分,药理及临床研究表明 α -细辛醚单体具有镇静、祛痰、止咳、平喘^[2-4]和抗癫痫作用^[5-8]。薛澄一等^[6]将从石菖蒲挥发油中分离所得的 α -细辛醚治疗癫痫大发作,有效率达 83.3%。张扬达等^[8]应用人工合成的 α -细辛醚治疗各种类型癫痫发作 114 例并与 57 例苯妥因治疗的对照组进行比较,结果发现 α -细辛醚有与苯妥因相似的疗效,尤其对于病程短的癫痫大发作疗效更佳,可作为癫痫初发患者的首选药物之一。近年来已有 α -细辛醚单一成分在家兔体内及人体中药动力学研究的报道^[9,10]。而对抗癫痫复方中 α -细辛醚的药代动力学研究尚未见报道。本研究采用 HPLC 法测定大鼠 ig 给药后不同时间血浆中 α -细辛醚的浓度,并进行了药物动力学参数测定。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂:小儿抗痫胶囊(由天津中医学院第一附属医院药剂科提供,规格 0.3 g/粒,批号 990618);小儿抗痫胶囊石菖蒲阴性对照品(自制)。上述两种实验药品分别于实验前 12 h 称取适量,研成极细粉末,加蒸馏水调至浓度为 0.3 g/mL 的混悬液,密封 4℃ 冰箱保存备用。用时充分振荡使其

均匀。 α -细辛醚对照品(由中国药科大学药物分析研究室丁黎提供)。甲醇为色谱纯(美国);石油醚、乙醚均为分析纯(天津化学试剂二厂);超纯水(自制);肝素钠(中国徐州万邦生化制药有限公司)。

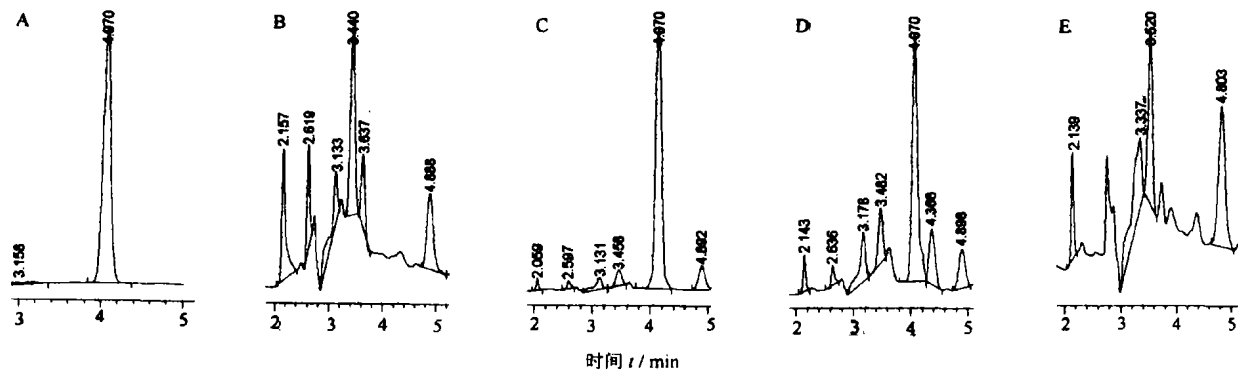
1.2 动物:Wister 大鼠 100 只,体重(240±10)g,雌性,由中国军事医学科学院第四研究所实验动物室提供。

1.3 仪器:美国惠普公司 HP1100 高效液相色谱系统:VWD 紫外可见光检测器,四元泵,真空脱气机,7725 型手动进样阀,HP1100 化学工作站;DU-530 核酸蛋白仪(美国贝克曼公司);AS3120A 超声波发生器(奥特赛恩斯有限公司);MVS-1 旋涡混合器(北京北德科学器材有限公司);ALLEGRA 64R 台式高速离心机(美国贝克曼公司);石英自动双重纯水蒸馏器(江苏金城教学仪器厂);80-1 型离心机(上海手术器械厂)。

1.4 血浆中 α -细辛醚测定方法的建立

1.4.1 方法的专属性:分别取大鼠空白血浆萃取样品、空白血浆中加 α -细辛醚的萃取样品、大鼠 ig 小儿抗痫胶囊后血浆萃取样品、大鼠 ig 小儿抗痫胶囊石菖蒲阴性对照品后血浆萃取样品,采用 HPLC 法进行测定。 α -细辛醚对照品保留时间为 4.070 min。结果表明大鼠血浆中内源性成分及抗痫胶囊中其他药物成分对 α -细辛醚的测定无干扰。色谱图见图 1。

1.4.2 色谱条件:色谱柱为 Irregular C₁₈ 柱(250



A- α -细辛醚对照品 B-空白血浆 C-空白血浆加 α -细辛醚 D-ig 小儿抗痫胶囊 E-ig 小儿抗痫胶囊石菖蒲阴性对照品

图 1 HPLC 图

mm×4.6 mm, 10 μ m);柱温:35℃;流动相:甲醇-水(88:12);流速:1.0 mL/min;检测波长:259 nm;进样量 20 μ L。

1.4.3 给药方案与样品采集:成年雌性大鼠 100 只,体重(240±10)g,随机分为 10 组,每组 10 只。大鼠实验前 12 h 开始禁食(不禁水)。给药剂量根据动物和小儿体表面积比例换算出大鼠相当于人的

临床等效剂量为 1.25 g/kg。设定低剂量为临床等效剂量。低、中、高剂量之比为 1:2:4。除空白对照组大鼠外,按 1.25, 2.5, 5 g/kg 的给药剂量分别给大鼠 ig 浓度为 0.3 g/mL 的小儿抗痫胶囊混悬液。ig 前(0 min)和 ig 后 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 min 于大鼠股动脉采血(每个时间点处理 3 只大鼠,每组加空白测 11 个点),肝素抗凝,

离心 15 min (3 000 r/min), 分离出血浆

1.4.4 血浆样品的处理与测定: 精密量取血浆 1 mL, 置 10 mL 具塞离心试管中, 加甲醇 1 mL, 混合醚液 4 mL (石油醚-乙醚 = 1:1) 密封, 涡旋振荡 20 s 混匀, 超声波提取 10 min 静置, 离心 15 min (3 000 r/min), 分取有机层, 35℃ 水浴通 N₂ 气流挥干。样品干管于 -18℃ 冰冻保存。测定前取出样品干管, 精密加入 200 μL 甲醇溶解残渣, 涡旋振荡 1 min 混匀, 超声波提取 5 min, 高速离心 10 min (12 000 r/min), 吸取上清液 20 μL 进样, 在上述色谱条件下分离测定。

1.4.5 对照品溶液的制备: 精密称取 α-细辛醚对照品 9.92 mg, 置 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 制得浓度为 992 μg/mL 的 α-细辛醚母液 I。取母液 I 稀释 20 倍后制得浓度为 49.6 μg/mL α-细辛醚母液 II。将上述配制好的对照溶液密封后置 4℃ 冰箱保存备用。

1.4.6 标准曲线的制备: 精密量取空白血浆 1 mL 分别置于 10 mL 具塞离心试管中, 精密加入浓度为 49.6 μg/mL α-细辛醚对照品液 1, 2.5, 50, 75, 100 μL 混匀, 按照与“血浆样品的处理与测定”相同方法进行处理与测定。以 α-细辛醚的浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 以峰面积对进样浓度进行直线回归。得回归方程为 $Y = 83.0291X - 3.3190$, $r = 0.99991$ 结果显示具有良好的线性关系。

1.4.7 最低检出量和最低检出浓度: 取浓度为 49.6 μg/mL α-细辛醚对照品液 10 μL 4 份, 分别用甲醇定容为 1, 2, 5, 10 mL, 进样 20 μL, 结果均能清晰测出 α-细辛醚的色谱峰, 故最低检出量为 1 ng, 最低检出浓度为 0.05 μg/mL (信噪比为 3.5)。

1.4.8 回收率试验: 分别于 1 mL 大鼠空白血浆中加入 1, 50, 100 μL 浓度为 49.6 μg/mL 的 α-细辛醚对照品液, 混匀, 得到 0.25, 12.40, 24.80 μg/mL 3 种不同浓度的 α-细辛醚血浆样品, 按照与“血浆样品的处理与测定”的相同方法进行处理和测定。将回收率试验样品测定值代入标准曲线方程, 计算出 α-细辛醚浓度, 以测定值与实际值之比计算回收率, 结果 3 种浓度的平均回收率分别为 96.32%、99.94%、99.25%。RSD 分别为 3.35%、1.23%、0.97% ($n = 6$)。

1.4.9 精密度试验: 按照与“血浆样品的处理与测定”的相同方法进行处理和测定本方法的日内精密度和日间精密度。结果本法日内精密度 RSD < 5% ($n = 6$), 日间精密度 RSD < 5% ($n = 6$)。

1.4.10 数据分析: 血药浓度-时间数据采用中国药理学学会数学药理专业委员会的 3P97 实用药代动力学计算程序软件进行拟合, 统计学处理采用 SPSS 软件进行方差分析。

2 结果

2.1 α-细辛醚在大鼠体内的药时过程: 大鼠 ig 不同剂量小儿抗痢胶囊后, 不同时间的 α-细辛醚的血药浓度测定结果见表 1 不同用药剂量的 α-细辛醚平均血药浓度 $\log C-t$ 拟合曲线见图 2

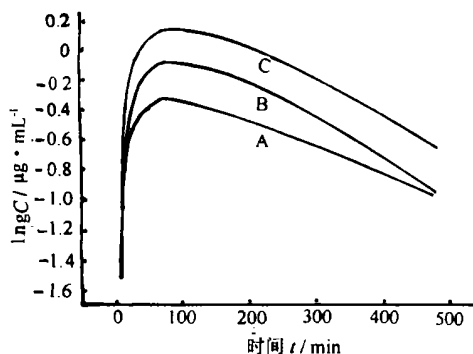
表 1 不同剂量组大鼠 α-细辛醚血药

浓度值比较 ($\mu\text{g/mL}$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

取样时间 (min)	1.25	2.5	5
5	0.13 ± 0.033	0.17 ± 0.010	0.28 ± 0.053 *
15	0.19 ± 0.054	0.22 ± 0.025	0.34 ± 0.019 *
30	0.24 ± 0.066	0.28 ± 0.051	0.38 ± 0.009
60	0.35 ± 0.124 △	0.63 ± 0.130	0.80 ± 0.109 *
90	0.79 ± 0.047 △△	1.46 ± 0.285 *	2.45 ± 0.063 * △△
120	0.35 ± 0.121	0.67 ± 0.024	1.30 ± 0.260 * △△
180	0.29 ± 0.099 △△	0.49 ± 0.053 *	0.75 ± 0.024 * △△
240	0.16 ± 0.085 △△	0.33 ± 0.033 *	0.59 ± 0.011 * △△
360	0.13 ± 0.083 △	0.28 ± 0.057	0.49 ± 0.004 * △△
480	0.12 ± 0.081 △△	0.27 ± 0.022 *	0.48 ± 0.014 * △△

与 1.25 g/kg 相应时间点相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

与 2.5 g/kg 相应时间点相比: △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$



A-1.25 g/kg B-2.5 g/kg C-5.0 g/kg

图 2 α-细辛醚平均血药浓度 $\log C-t$ 拟合曲线

2.2 α-细辛醚在大鼠体内的药代动力学参数: 将低、中、高不同剂量组 α-细辛醚在大鼠体内的血药浓度-时间数据输入 3P97 药代动力学计算程序处理, 分别用一室、二室模型拟合药时曲线。将两种模型的处理结果进行比较, 选择其中残差平方和 (SUM) 值最小、拟合度 (r^2) 最佳、AIC 值最小者定为所测药物的最佳室型。结果 α-细辛醚在大鼠体内的药物动力学过程属一级吸收-一室消除的动力学模型。α-细辛醚在大鼠体内药动学参数见表 2

由表 2 可见低、中、高 3 个不同剂量组的 k_a , k_e , $T_{(peak)}$, CL , V 数值均变化不大。为了研究低、中、高 3

表 2 不同剂量组大鼠体内 α -细辛醚药动力学参数

参 数	单 位	α 细辛醚 (g /kg)		
		1. 25	2. 5	3. 75
A	$\mu\text{g} / \text{mL}$	0. 778 4	2. 356 9	3. 802 3
k_e	1/min	0. 004 3	0. 006 6	0. 006 1
k_a	1/min	0. 026 6	0. 017 7	0. 016 4
$t_{1/2}(\text{ka})$	min	26. 08	39. 07	42. 26
$t_{1/2}(\text{ke})$	min	162. 11	105. 29	113. 94
$T(\text{peak})$	min	91. 93	88. 85	96. 12
$C(\text{max})$	$\mu\text{g} / \text{mL}$	0. 46	0. 83	1. 33
AUC	$\mu\text{g}^{\circ} \text{min} / \text{mL}$	152. 75	225. 15	393. 21
$CL / F(\text{s})$	mL / min	0. 008	0. 011	0. 010
$V / F(\text{c})$	mL / kg	1. 91	1. 69	1. 57

个不同剂量组药代动力学参数 C_{max} $AUC_{0-480\text{min}}$ 与用药剂量间的关系,以给药剂量为自变量, C_{max} $AUC_{0-480\text{min}}$ 为应变量分别对其进行了直线回归与相关分析. 结果剂量与 C_{max} 的变化为正相关, $r=0.99459$,直线回归方程为 $Y=0.227429X+0.021$ 剂量与 $AUC_{0-480\text{min}}$ 的变化为的正相关, $r=0.99936$,直线回归方程为 $Y=64.565714X+68.72$

3 讨论

3.1 本研究建立的 HPLC法测定大鼠 ig 不同剂量小儿抗痫胶囊后 α -细辛醚血药浓度的实验方法,操作简便,结果可靠,仪器较为普及,方法专属性好,回收率、精密度和重现性均较好. 血浆中的内源性物质及小儿抗痫胶囊中其他成分不干扰 α -细辛醚的测定,为监测 α -细辛醚血药浓度提供可行方法

3.2 α -细辛醚在大鼠体内的药物动力学过程可用一级吸收-室消除的动力学模型来描述. 吸收速率常数 K_a 为 $(0.020 \pm 0.0055) \text{min}$, α -细辛醚的血药浓度在 $(88.97 \pm 7.095) \text{min}$ 即达峰值,吸收半衰期 $T_{1/2k_e}$ 为 $(35.8 \pm 8.57) \text{min}$, α -细辛醚在大鼠体内吸收快,分布快,药物起效快. 消除半衰期 $T_{1/2k_e}$ 为 $(127.1 \pm 30.62) \text{min}$, $T_{1/2k_e}$ 与 $T_{1/2k_a}$ 比较, α -细辛醚在体内主要以消除过程为主,属慢消除过程,故药物在体内作用时间持久.

3.3 α -细辛醚为石菖蒲的主要有效成分,具有显著镇静、抗惊厥等药理作用. 本研究选择小儿抗痫胶囊主药石菖蒲的主要有效成分之一 α -细辛醚作为研究对象,既符合抗痫胶囊的中医组方原则,即熄风止

惊和逐痰开窍,又符合这种主要成分的现代药理研究结果

3.4 中药复方多采用水煎口服的传统给药途径. 水煎后复方进入机体的成分以水溶性成分为主,且在煎煮过程中一些成分可能会发生化学结构的改变而生成新成分. 因此为了与临床用药保持一致,本实验所用药液不进行煎煮,而是用蒸馏水制成混悬液,避免了脂溶性成分的丢失以及在水煎过程中的分解、挥发、沉淀等一系列问题.

3.5 本研究所用实验动物为健康大鼠. 根据黄熙的“辨证药理学”新假说^[11],证态可明显改变药理学参数. 如任平等^[12]通过比较健康与脾虚大鼠川芎嗪的动力学差异,得出大鼠的脾虚状态明显地影响川芎嗪在体内的吸收、分布、代谢和排泄的结论. 所以在今后的研究中不仅要考察健康动物体内小儿抗痫胶囊的药代动力学特征,也要对于癫痫发作模型的动物进行研究. 把复方效应成分药理学研究与中医证的研究结合起来,探讨两者之间的内在联系.

参考文献:

[1] 马融,向阳,李新民. 小儿癫痫 421例临床观察[J]. 中国医药学报,1994,9(2): 22-24.
[2] 江苏省石菖蒲临床研究协作组. 关于 α -细辛脑平喘和兴奋呼吸中枢作用的临床研究[J]. 中华结核和呼吸系统疾病杂志,1981,4(1): 21-23.
[3] 胡伯渊,纪耀源. 山羊有 α -细辛醚对 4种呼吸道病毒抑制效果观察[J]. 江苏医药,1984,10(5): 18.
[4] 杨玉. α -细辛脑片治疗 148例慢性阻塞性肺部疾病[J]. 新药药理与临床,1986,5(4): 210-212.
[5] 赵士正. α -细辛醚抗癫痫作用动物实验及机理探讨[J]. 中西医结合杂志,1984,4(8): 490.
[6] 薛澄一,赵汉林,赵士正. 石菖蒲抗癫痫活性成分研究(一)[J]. 中国医院药学杂志,1983,3(8): 341-343.
[7] 陈建家. α -细辛醚抗癫痫的药理作用及其临床应用[J]. 药学通报,1982,17(9): 50.
[8] 张扬达,周树舜,许爱球,等. α -细辛脑治疗癫痫 114例[J]. 新药与临床,1990,9(2): 91-93.
[9] 杨巷菁,赵真玲. 气相色谱法测定血液中 α -细辛醚的浓度[J]. 中草药,1987,18(10): 10-11.
[10] 杨正鸿,吴闯,宋次娇. α -细辛脑在人体中的药理学[J]. 中国医院药学杂志,1993,13(1): 7-8.
[11] 黄熙,马援,任平. “证治药理学”假说的科学依据与前景[A]. 陈可冀. 迈向 21世纪的中西医结合[C]. 北京: 中国医药科技出版社,1991.
[12] 任平,黄熙,蒋永培,等. 四君子汤对脾虚大鼠胃动素及川芎嗪药理学特征的影响[J]. 中国中西医结合杂志,1997,17(1): 45-47.

敬告读者

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本,包括: 1974-1975年,1976年,1979年,1985-1994年(80元/年); 1995-1997年(110元/年); 1998年(120元); 1999年(135元); 2000年(180元); 2001年(200元); 1996年增刊(50元); 1997年增刊(45元); 1998年增刊(55元); 1999年增刊(70元); 2000年增刊(70元); 2001年增刊(70元). 欢迎来函来电订购,电话: 022-27474913; 022-23006821(传真).