

少腹逐瘀汤对布洛芬在大鼠体内药动学及代谢产物的影响

宿树兰, 崔文霞, 段金廛*, 尚尔鑫, 钱大玮, 唐于平

南京中医药大学 江苏省方剂高新技术研究重点实验室, 江苏 南京 210046

摘要: **目的** 揭示少腹逐瘀汤(SZD)对布洛芬在大鼠体内药动学特征及代谢产物的影响。**方法** 采用 HPLC-DAD 法定量分析 SZD 与布洛芬合用后布洛芬药动学参数的变化; 采用 UHPLC-QTOF-MS 联用方法, 利用碰撞能量梯度(MS^E)和质量亏损过滤(MDF)技术, 对 SZD 与布洛芬合用后布洛芬在血浆、尿液、粪便中的代谢产物变化进行研究。**结果** 单独给予布洛芬其在大鼠体内吸收较快, 0.5 h 达峰, 与不同剂量 SZD 合用后, t_{max} 均延长 ($P < 0.01$), C_{max} 均为下降趋势, 但与布洛芬组比较无统计学差异; 布洛芬与临床等效量的 SZD 合用后, AUC 显著增高 ($P < 0.05$), 提示其生物利用度提高, 表观清除率降低; 与 5 倍临床剂量的 SZD 合用后, $t_{1/2\alpha}$ 显著降低 ($P < 0.05$)。服药 2 h 后, 布洛芬与不同剂量 SZD 合用后其血药浓度下降均较布洛芬组缓慢。布洛芬单用时其代谢产物主要为 2'-羟基布洛芬、2'-羟基布洛芬-葡萄糖醛酸苷、2'-羧基布洛芬和布洛芬-葡萄糖醛酸苷; 与 SZD 合用后, 在血浆、尿液、粪便中共发现 17 个布洛芬的代谢物, 其中粪便中存在羟基化产物、降解产物、乙酰化产物、羟基硫酸化产物等; 血浆中存在去甲基化产物、羟基化产物、乙酰化产物以及硫酸酯化产物等; 尿液中代谢产物除半胱氨酸共价结合物外与布洛芬单用时一致。**结论** 布洛芬与 SZD 合用后, 其在大鼠体内的药动学过程发生变化, 且该变化与 SZD 的剂量存在一定关系, 为二者临床联合用药及进一步揭示其药效变化与机制提供了一定参考。

关键词: 少腹逐瘀汤; 布洛芬; 药动学; 代谢产物; UHPLC-QTOF-MS

中图分类号: R285.61; R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)03-0315-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.03.016

Effect of Shaofu Zhuyu Decoction on *in vivo* pharmacokinetics and metabolites of Ibuprofen in rats

SU Shu-lan, CUI Wen-xia, DUAN Jin-ao, SHANG Er-xin, QIAN Da-wei, TANG Yu-ping

Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of Shaofu Zhuyu Decoction (SZD) on *in vivo* pharmacokinetic characteristics and metabolites of Ibuprofen in rats. **Methods** HPLC-DAD method was established to quantitatively analyze the pharmacokinetic parameters of Ibuprofen combined with SZD. UHPLC-QTOF-MS, MS^E , and mass defect filtering (MDF) were used to investigate the metabolite changes of Ibuprofen in plasma, feces, and urine in rats after ig administration of Ibuprofen combined with SZD. **Results** The *in vivo* absorption of single Ibuprofen in rats was quick, which could reach the peak in 0.5 h. After combined with SZD at different concentration, t_{max} was prolonging ($P < 0.01$) and C_{max} was decreasing but no statistic significance was found compared with the Ibuprofen group. When Ibuprofen was used with SZD at the clinical equivalent amount, AUC values were significantly increased ($P < 0.05$), which showed that bioavailability was increased and the apparent clearance was decreased. When Ibuprofen was used with SZD at five-fold clinical equivalent amount, the $t_{1/2\alpha}$ of Ibuprofen was decreased significantly ($P < 0.05$). The decreases of blood-drug concentration after the administration for 2 h in Ibuprofen or Ibuprofen with SZD groups were slower than those in SZD single group. These indicated that the pharmacokinetic characteristics of Ibuprofen were different from those in Ibuprofen with SZD groups, which were dependent on the dosages of SZD. The metabolites of Ibuprofen used signally were 2'-hydroxy-Ibuprofen, 2'-hydroxy-Ibuprofen-glucuronide, 2'-carboxy-Ibuprofen, and Ibuprofen-glucuronide. Total 17 metabolites of Ibuprofen were identified from plasma, urine, and feces after combined with SZD. Hydroxylation, degradation, acetylation, and hydroxy-sulfate products were identified in rat feces, methylation, hydroxylation, acetylation, and sulfation products were identified in rat plasma. There was no significant difference of metabolites in urine except cysteine covalent conjugation. **Conclusion** The results provide the basis for the

收稿日期: 2012-10-29

基金项目: 江苏省高校自然科学重大基础研究资助项目(11KJA360002, 06KJA36022)

作者简介: 宿树兰(1974—), 女, 副教授, 从事中药资源化学与方药功效物质基础研究。Tel: (025)85811916 E-mail: sushulan1974@163.com

*通信作者: 段金廛, 教授, 博士生导师, 南京中医药大学副校长, 中国自然资源学会天然药物资源专业委员会主任委员, 国家 973 计划首席科学家。Tel: (025)85811116 E-mail: dja@njutcm.edu.cn

clinical use of Ibuprofen combined with SZD to illustrate the pharmacodynamic changes and mechanism.

Key words: Shaofu Zhuyu Decoction; Ibuprofen; pharmacokinetics; metabolite; UHPLC-QTOF-MS

临床上中西药联合应用的现象越来越普遍,尤其是慢性疾病的治疗往往联合使用多种药物,因此药物相互作用引起的临床效应也越来越受到关注^[1]。某些药物相互作用可以起到增效减毒的作用,但有些药物联合使用后不仅会导致疗效降低,甚至产生毒副反应,引发药源性疾病。中药与化学药联用后其药动学会发生变化,大鼠同时 ig 小青龙汤和卡马西平,能显著延长卡马西平的 $t_{\max}$ ^[2]; 将小柴胡汤和甲苯磺丁脲同时 ig 给予大鼠,甲苯磺丁脲的 $C_{\max}$ 显著升高,而 $t_{\max}$ 降低,其余指标未发生显著变化^[3]; 大鼠同时 ig 甘草水提物与华法令后,能减小华法令的 AUC,增加其 CL^[4]。因此,研究中西药之间潜在的相互作用,对于指导临床安全、合理用药具有十分重要的意义。

少腹逐瘀汤 (Shaofu Zhuyu Decoction, SZD) 为临床治疗妇科疾病尤其是痛经、月经不调等病症的常用有效方剂^[5-6], 该方出自清代王清任的《医林改错》, 由当归、川芎、赤芍、蒲黄、五灵脂、没药、延胡索、小茴香、肉桂、干姜 10 味中药组成。研究表明, SZD 能明显降低正常大鼠离体子宫自发运动的收缩和舒张强度, 抑制缩宫素所致大鼠离体子宫强烈收缩频率作用, 表明其有良好的子宫解痉作用; 可明显减轻塑料管所致大鼠子宫肿胀, 明显抑制棉球所致皮下肉芽肿, 表明其有抗炎作用; 能改善冰水浴及肾上腺素方法所致寒凝血瘀大鼠的全血黏度、血浆黏度、血沉、红细胞压积水平, 调节雌二醇和孕酮水平, 表明其有调节寒凝血瘀大鼠卵巢内分泌的功能^[7-8]。临床上常用于治疗月经不调、痛经、崩漏、坠胎、小产等疾患^[9]。

布洛芬是常用非甾体抗炎药, 具有较强的抗炎、抗风湿及解热镇痛作用, 常于月经前使用, 预防疼痛, 经期使用可解痉镇痛。研究表明, 布洛芬可使月经期间子宫内膜分泌前列腺素 ($\text{PGF}_2\alpha$) 浓度降低, 抑制 $\text{PGF}_2\alpha$ 对子宫的刺激, 与治疗前相比能显著增加子宫血流量, 缓解子宫平滑肌的缺血缺氧状态, 从而有效地改善原发性痛经^[10]。

临床上常采用中西医结合疗法同时使用布洛芬和 SZD 治疗原发性痛经, 治愈率达 87.9%, 具有疗效确切、标本兼治的特点^[11]。但二者之间的相互作用及协同增效作用的机制尚未见报道。本实验采用高效液相色谱-二极管阵列检测器 (HPLC-PDA) 对

不同剂量的 SZD 与布洛芬合用后布洛芬在大鼠体内的药动学特征进行研究; 采用 UHPLC-QTOF-MS 法对布洛芬及其与不同剂量的 SZD 配伍使用在大鼠血浆、粪便、尿液中的代谢产物进行分析鉴定, 以评价 SZD 对布洛芬吸收、代谢的影响, 探讨二者的相互作用, 以期二者联合用药提供一定依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

美国 Waters 2695 高效液相色谱系统, Waters 2996 PDA, Empower 数据管理系统。Waters Acquity TM UHPLC-MS 联用仪 (美国 waters 公司), 配有电喷雾离子源 (ESI) 及 MasslynxTM 4.1 数据处理软件, EPED 超纯水机 (南京易普易达科技发展有限公司), Anke (TDL240B) 离心机 (上海安寿科学仪器厂)。KQ—250E 型超声波清洗器 (工作频率 40 kHz)。

1.2 材料

甲醇 (江苏汉邦科技有限公司), 乙腈 (美国 TEDIA 公司) 均为色谱纯, 甲酸 (MERCK) 为分析纯, 枸橼酸钠 (天津市生物化学制药厂, 批号 20071107)。布洛芬缓释片 (惠州大亚制药股份有限公司, 0.3 g/片, 批号 100805037), 布洛芬 (批号 100179-200804) 和吲哚美辛 (批号 100258-200904) 对照品购自中国食品药品检定研究院; 甲醇、乙腈为色谱纯, 磷酸二氢钾、磷酸为分析纯, 水为实验室自制超纯水。

1.3 动物

雌性 SD 大鼠 (180~220 g), 动物合格证号 SCXK (浙) 20080033, 由浙江省实验动物中心提供。

2 方法

2.1 少腹逐瘀汤样品的制备

称取 SZD 组方药材粗粉 1.5 kg, 按照当归、川芎、赤芍、肉桂、小茴香、五灵脂、没药、蒲黄、延胡索、干姜 (3:1:2:1:0.5:2:1:3:1:1) 比例配比, 水加热提取 2 次, 第 1 次加 10 倍量水煎煮 2 h, 第 2 次加 8 倍量水煎煮 1.5 h, 合并 2 次煎出液, 浓缩至 720 mL, 得到生药 2.1 g/mL SZD 全方水煎液。

2.2 对照品溶液与内标溶液的制备

分别精密称取布洛芬、吲哚美辛对照品适量, 用甲醇配成质量浓度分别为 153、35.4 $\mu\text{g/mL}$ 的对

照品储备液,将布洛芬溶液稀释成质量浓度分别为9.16、30.60、61.20、91.8、122.40、153.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。

2.3 空白血浆供试品溶液的制备

取体质量为200~220 g的健康雌性大鼠,禁食不禁水12 h后眼眶静脉丛取血0.5 mL,置于装有枸橼酸钠抗凝剂的1.5 mL离心管中,3 000 r/min离心10 min,得上层血浆。取100 μL 血浆,加入300 μL 乙腈,涡旋1 min,在3 000 r/min条件下离心10 min,取上清液于40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气吹干,进样时用乙腈复溶至100 μL ,涡旋振荡1 min,在13 000 r/min条件下离心10 min,取上清液10 μL 进样分析。

2.4 血浆样品的收集与制备

将24只大鼠正常条件下饲养1周后,随机分成4组,每组6只,分笼饲养:布洛芬-SZD5(Ibu-SZD5)组,按生药21 g/kg(临床剂量的5倍)剂量ig SZD,每天1次,连续7 d;布洛芬-SZD1(Ibu-SZD1)组,按生药4.2 g/kg(临床等效剂量)剂量ig SZD,每天1次,连续7 d;布洛芬(Ibu)组ig生理盐水,对照组正常饲养。大鼠在实验前12 h禁食不禁水。第7天,ig SZD 30 min后,眼眶静脉丛采血0.5 mL,随后ig布洛芬54 mg/kg,并于0.25、0.5、1、1.5、2、4、6、8、12 h取血0.5 mL,用枸橼酸钠抗凝,在3 000 r/min条件下离心10 min,取上层血浆于1.5 mL具塞塑料离心管中,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,备用。

取100 μL 血浆,加入内标吡哌美辛(35.4 $\mu\text{g/mL}$)50 μL ,涡旋1 min,加入300 μL 乙腈涡旋混匀30 s,在3 000 r/min下离心10 min取上清液,氮气吹干,再加500 μL 70%乙腈-水复溶,在13 000 r/min条件下高速离心10 min,取上清液作为血浆供试品溶液。

2.5 血浆标准样品的制备

取空白血浆100 μL ,分别加入不同质量浓度的布洛芬对照品溶液50 μL ,再加入内标吡哌美辛(35.4 $\mu\text{g/mL}$)50 μL ,涡旋1 min,加入300 μL 乙腈后,涡旋1 min,在3 000 r/min条件下离心10 min,取上清液于40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气吹干,进样时用乙腈复溶至100 μL 。配制成布洛芬质量浓度为1.02、3.4、6.8、10.2、13.6、17.0 $\mu\text{g/mL}$ 的血浆样品,取上清液10 μL 进样。

2.6 血浆、尿液与粪便样品的收集与制备

各组大鼠按照“2.4”项方法给药后,将大鼠放入代谢笼中,收集给药后12 h内的尿液、粪便,并于给药后1.5 h眼眶静脉丛取血0.5 mL,置于装有枸橼酸钠的离心管内,在3 000 r/min条件下离心10

min,分离出血浆。

取1 mL尿液加入3 mL甲醇,在3 000 r/min条件下离心10 min,取上清液用氮气吹干,加入500 μL 70%乙腈水溶液复溶,在13 000 r/min条件下高速离心10 min后,取上清液作为尿液供试品溶液。

粪便放入37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱内烘干,用70%甲醇超声30 min后取上清液,吸取1 mL上清液,在3 000 r/min条件下离心10 min,上清液用氮气吹干,加入500 μL 70%乙腈水溶液复溶,在13 000 r/min条件下高速离心10 min后,取上清液作为粪便供试品溶液。

2.7 HPLC 分析方法

采用Dikma Diamonsil C₁₈色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈-0.02 mol/L磷酸二氢钾水溶液(85:15)(用H₃PO₄调pH 3.8);检测波长221 nm;体积流量1 mL/min;柱温30 $^{\circ}\text{C}$;进样量10 μL 。

2.8 UHPLC-QTOF-MS 分析条件

2.8.1 色谱条件 Acquity UHPLC BEH-C₁₈色谱柱(50 mm $\times$ 2.1 mm,1.7 μm);流动相为乙腈(A),0.5%甲酸水溶液(B);梯度洗脱:0~4 min,5%~15% A;4~9 min,15%~30% A;9~12 min,30%~35% A;12~15 min,35% A;15~18 min,35%~50% A;18~21 min,50%~75% A;21~26 min,75%~95% A;26~28 min,95%~95% A;29 min,5% A。体积流量0.4 mL/min;柱温30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.8.2 质谱条件 ESI源,扫描方式:ESI⁺模式,毛细管电压:3.0 kV,锥孔电压:50 V,萃取电压:2.0 V,离子源温度:120 $^{\circ}\text{C}$,脱溶剂气温度:350 $^{\circ}\text{C}$,锥孔气流量:50 L/h,脱溶剂气流量:600 L/h;准确质量测定采用亮氨酸-脑啡肽(leucine-enkephalin,ESI⁺ m/z :556.277 1,ESI⁻ m/z :555.261 5)溶液为锁定质量溶液。质量扫描范围 m/z :100~1 000。

2.9 数据处理

采用DAS2.0软件进行拟合,应用统计矩原理,以统计矩分析为基础的非房室模型方法对实验数据进行拟合,求得给予不同剂量SZD后布洛芬的药动学参数。

2.10 MetabolynxTM 处理方法

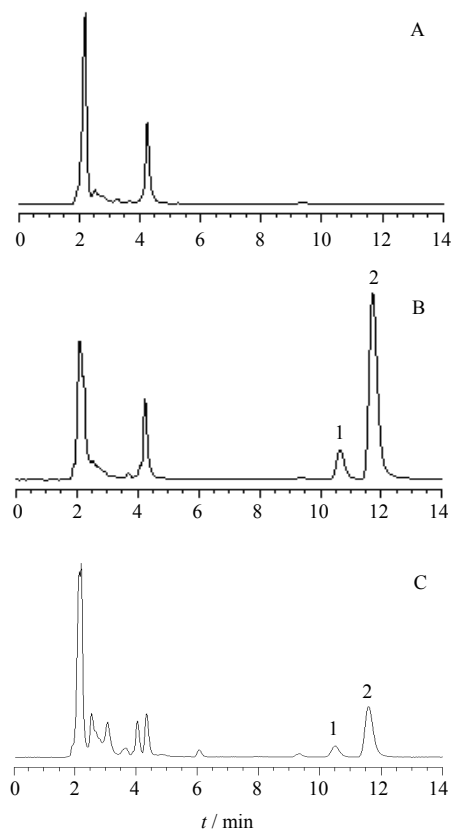
将待测化合物I、II相可能代谢产物输入MetabolynxTM软件中,质谱数据检测误差范围设为 $<1\times 10^{-5}$,并将质量亏损过滤应用于数据处理。

3 结果

3.1 方法学考察与结果

3.1.1 专属性考察 分别取空白血浆和含布洛芬血

浆,按上述色谱条件进样分析,HPLC 色谱图见图 1。可知,布洛芬和吲哚美辛之间分离良好,血浆中的内源性物质不干扰样品测定,布洛芬和吲哚美辛的保留时间分别为 11.98、10.51 min,说明该分析方法的专属性良好。



A-空白血浆 B-空白血浆+内标物+布洛芬 C-血浆样品 (1-吲哚美辛, 2-布洛芬)

A-blank plasma B-blank plasma with internal standard and Ibuprofen

C-plasma sample with drug (1-indomethacin, 2-Ibuprofen)

图 1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

3.1.2 标准曲线的制备 将血浆标准溶液样品进样,以样品峰与内标峰面积的比值对血浆中布洛芬的质量浓度进行线性回归分析,得到血浆中布洛芬的线性回归方程 $Y=6.1447X-0.6275$ ($r=0.9980$),血浆中布洛芬在 1.02~17.0 $\mu\text{g/mL}$ 内线性关系良好。

3.1.3 精密度与准确度 取空白血浆 100 μL ,精密加入 50 μL 内标溶液,再精密加入布洛芬对照品溶液,配制成低、中、高 3 个质量浓度(分别为 3.4、10.2、17.0 $\mu\text{g/mL}$)的质量控制样品,每个质量浓度平行配制 5 份,按空白血浆处理方法处理后,分别于日内测定及连续 3 d 测定,计算日内、日间精密度及准确度,结果(表 1)表明方法的精密度与准确度良好。

表 1 方法精密度和准确度考察结果

Table 1 Results of precision and accuracy

质量浓度 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	日内精密度 (RSD) / %	日间精密度 (RSD) / %	准确度(RE) / %
3.4	3.55	6.75	5.53
10.2	2.44	7.90	7.24
17.0	2.81	5.31	4.88

3.1.4 稳定性试验 配制质量浓度分别为 3.4、10.2、17.0 $\mu\text{g/mL}$ 的布洛芬血浆样品,分别置于室温、冻融循环 3 次、-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰冻存放 7 d,按照“2.3”项下操作,测定布洛芬血药浓度,考察样品稳定性。布洛芬血浆样品在室温(25 $^{\circ}\text{C}$)条件下存放 12 h 稳定($\text{RSD}\leq 7.42\%$);在冻融 3 次(-20 $^{\circ}\text{C}$)条件下存放 7 d 稳定($\text{RSD}\leq 3.96\%$);在冰冻(-20 $^{\circ}\text{C}$)条件下存放 7 d 稳定($\text{RSD}\leq 4.63\%$),结果表明符合生物样本分析过程中稳定性要求。

3.1.5 回收率试验 取空白血浆 100 μL ,精密加入不同质量浓度布洛芬对照品溶液,使血浆中药物质量浓度分别为 3.4、10.2、17.0 $\mu\text{g/mL}$,每个质量浓度平行配制 5 份,按“2.3”项下操作,计算回收率,布洛芬(Ibu-SZD5 组)在低、中、高浓度下的回收率分别为 $(80.3\pm 3.9)\%$ 、 $(86.6\pm 3.0)\%$ 、 $(81.1\pm 1.2)\%$ 。

3.2 少腹逐瘀汤对布洛芬在大鼠体内药动学的影响

大鼠 ig 给予布洛芬溶液后,血浆中药物平均浓度-时间曲线见图 2,药动学参数见表 2。给药后,Ibu 组中药物在大鼠体内吸收较快,0.5 h 达峰,与不同剂量 SZD 合用后, t_{max} 均延长($P<0.01$), C_{max} 均为下降趋势,但与 Ibu 组无统计学差异;Ibu 与临床等效量的 SZD 合用后,AUC 显著增加($P<0.05$),提示其生物利用度提高,表观清除率降低;与 5 倍临床剂量的 SZD 合用后, $t_{1/2z}$ 显著降低($P<0.05$)。服药 2 h 后,Ibu-SZD5 组、Ibu-SZD1 组大鼠血药浓度下降较 Ibu 组缓慢。结果表明,布洛芬与 SZD 合用后,其在大鼠体内的药动学过程发生变化,且该变化与合用 SZD 的剂量存在一定的关系。

3.3 少腹逐瘀汤对布洛芬代谢产物的影响

3.3.1 MetabolynxTM 处理设置^[12-13] 将布洛芬 I 相、II 相代谢途径可能产生的代谢物输入 MetabolynxTM 软件 Metabolite List 窗口中,质谱数据检测误差范围 $<10\times 10^5$,并将质量亏损过滤(MDF)应用于空白血浆与含药血浆数据的处理, MetabolynxTM 软件可在消除基质干扰的情况下,批处理数据并获得可能的代谢产物信息。

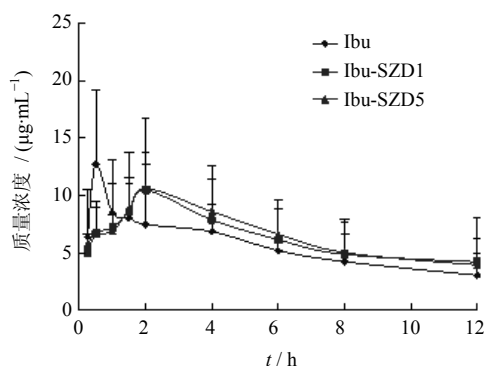


图2 大鼠ig布洛芬后血浆中药物浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Concentration-time curves of Ibuprofen in plasma of rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表2 大鼠ig布洛芬 ($54 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 后主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Main pharmacokinetic parameters of rats after ig administration of Ibuprofen ($54 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	单位	Ibu 组	Ibu-SZD 组	Ibu-SZD 组
$AUC_{0 \sim t}$	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	70.04 ± 12.74	$76.46 \pm 16.40^*$	69.70 ± 11.72
$AUC_{0 \sim \infty}$	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	97.18 ± 16.63	$107.04 \pm 21.13^*$	92.98 ± 22.96
$MRT_{0 \sim t}$	h	5.07 ± 0.26	5.08 ± 0.18	4.83 ± 0.20
$MRT_{0 \sim \infty}$	h	10.52 ± 1.08	10.75 ± 1.05	$8.18 \pm 1.09^*$
$t_{1/2z}$	h	6.53 ± 0.56	6.78 ± 0.88	$5.07 \pm 0.83^*$
$t_{\max}$	h	0.50 ± 0.05	$2.00 \pm 0.14^{**}$	$2.00 \pm 0.49^{**}$
$V_{z/F}$	$\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	6.19 ± 1.41	5.87 ± 1.11	$4.55 \pm 0.36^*$
$CL_{z/F}$	$\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.65 ± 0.11	0.62 ± 0.12	0.70 ± 0.13
$C_{\max}$	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	12.71 ± 2.87	11.47 ± 2.42	10.61 ± 1.43

与布洛芬组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs Ibuprofen group

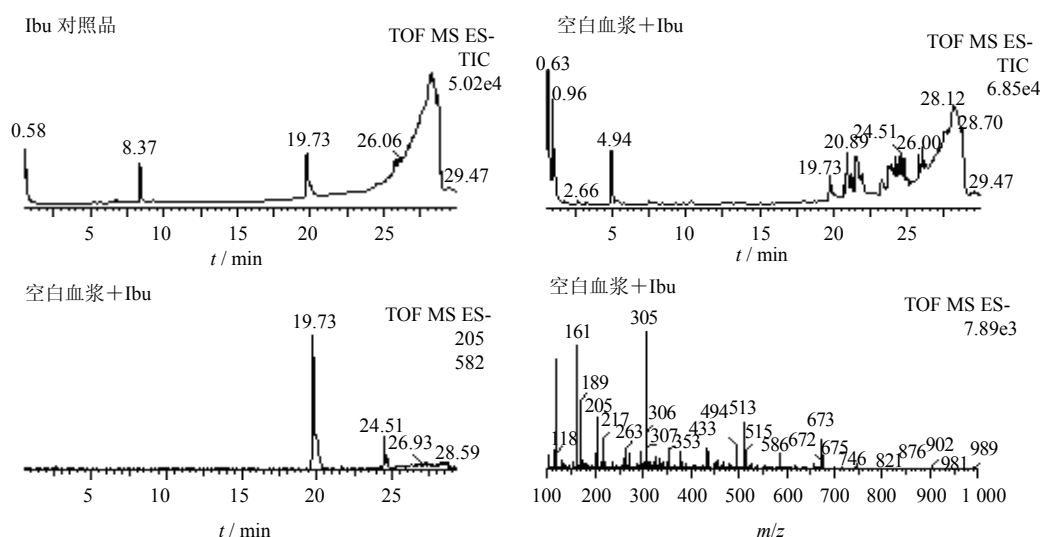


图3 负离子模式下布洛芬对照品及空白血浆的 UHPLC-QTOF-MS 总离子流色谱与质谱

Fig. 3 UHPLC-QTOF-MS total ion chromatograms and MS of Ibuprofen reference substance and blank plasma in negative ion mode

3.3.2 Metabolyx™ 处理结果 经 Metabolyx™ 软件处理, 初步筛选出可能的代谢产物, 根据代谢物与母体化合物常有相似的质谱特征离子, 对代谢物进行识别, 再结合其他碎片离子的信息和药物的生物体内代谢规律, 对代谢物的结构做出合理推断, 鉴定代谢产物。

3.3.3 大鼠含药血浆、粪便、尿液的分析结果 采用 UHPLC-QTOF-MS 联用方法在负离子条件下对大鼠含药血浆、粪便和尿液样品进行分析, 并与空白血浆、布洛芬对照品总离子流图对照 (图 3), 结果表明在大鼠血浆、粪便和尿液中可检测到布洛芬及其代谢产物, 总离子流图见图 4。

3.3.4 布洛芬在大鼠含药血浆、粪便、尿液中的代

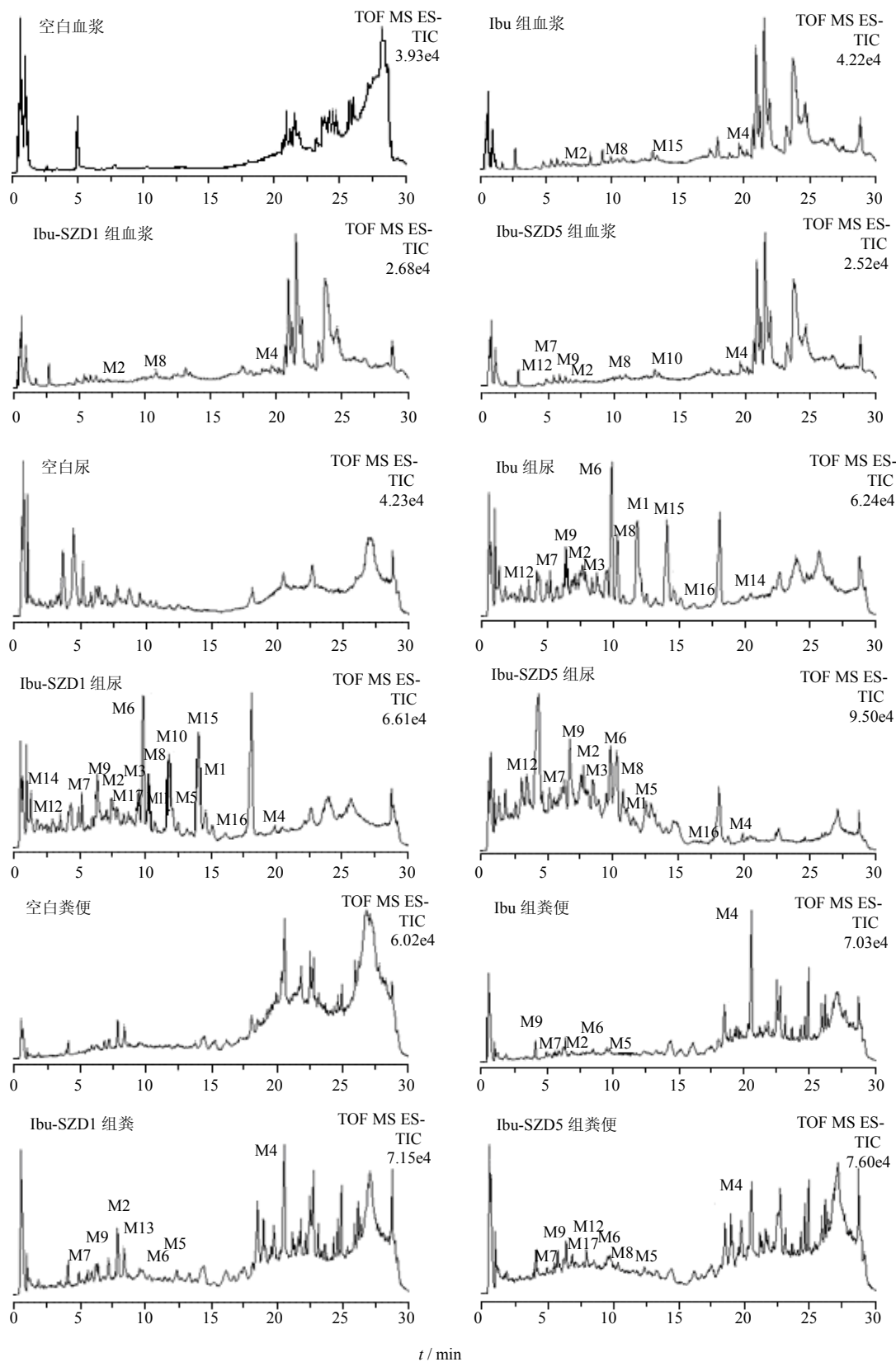


图4 负离子模式下空白和给药大鼠血浆、尿液、粪便的 UHPLC-QTOF-MS 总离子流图

Fig. 4 UHPLC-Q-TOF-MS total ion chromatograms of blank plasma, rat plasma with drug, urine, and feces in negative ion mode

代谢产物分析鉴定 质谱数据经 MetabolynxTM 软件处理,布洛芬对照品在空白大鼠血浆 ESI⁺图中保留时间为 19.73 min, 准分子离子[M-H]⁺为 *m/z* 205, 其中碎片离子 161、116 推测为结构中脱去 1 个中性分子 CO₂ 和异丙基生成的。

单独给予布洛芬后其在体内的主要代谢产物为 2'-羟基布洛芬 (M6)、2'-羟基布洛芬-葡萄糖醛酸苷 (M17)、2'-羧基布洛芬 (M8) 和布洛芬-葡萄糖醛酸苷 (M16) (图 5), 口服给药后约有 60% 以羟基、羧基及相应的葡萄糖醛酸结合物的形式由尿中排出^[14]。

经过 MetabolynxTM 软件处理和文献数据对比, 在血浆、尿液、粪便中共发现 17 个布洛芬代谢产物, 包括羟化、甲基化、磺化、葡萄糖醛酸化、半胱氨酸化、去甲基化、失氧等多种类型 (表 3)。布洛芬与 SZD 合用后, 血浆中发现去甲基化产物、羟基化产物、乙酰化产物以及硫酸酯化产物等; 粪便中发现羟基化产物、降解产物、乙酰化产物、羟基硫酸酯化产物等; 尿液中代谢产物变化不明显。这些结果

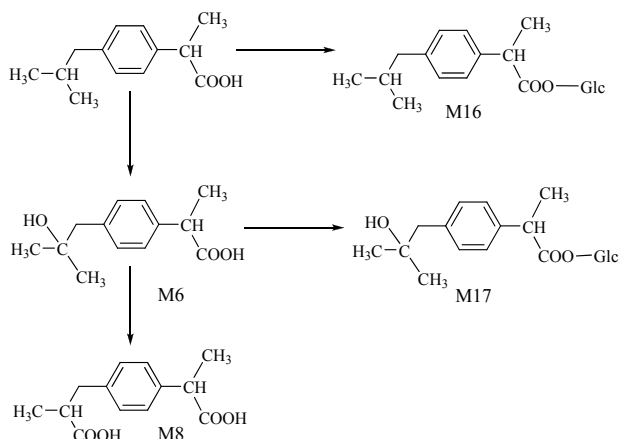


图 5 单用布洛芬的主要代谢途径与代谢产物

Fig. 5 Main metabolic pathway and metabolites of single Ibuprofen

为二者临床用药提供了一定的参考和依据。

4 讨论

本实验曾采用肉桂酸作为内标^[15], 但由于 SZD 中含有肉桂, 主要成分为肉桂酸, 会产生一定干扰, 影响两者的分离, 后改用吲哚美辛作为内标, 出峰

表 3 布洛芬在血浆、尿液、粪便中的代谢产物鉴定结果

Table 3 Identified metabolites of Ibuprofen in rat plasma, urine, and feces

编号	相对分子质量	<i>t_R</i> / min	代谢方式	分子式	血浆			粪便			尿液		
					Ibu- Ibu	Ibu- SZD1	Ibu- SZD5	Ibu- Ibu	Ibu- SZD1	Ibu- SZD5	Ibu- Ibu	Ibu- SZD1	Ibu- SZD5
M1	161.133 0	11.45	去碳酸基	C ₁₂ H ₁₇	—	—	—	—	—	—	+	+	+
M2	188.121 0	7.90	去羟基	C ₁₃ H ₁₆ O	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M3	190.135 8	9.23	失氧	C ₁₃ H ₁₈ O	—	—	—	—	—	—	+	+	+
M4	206.130 7	19.89	原型	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M5	220.146 3	12.43	甲基化	C ₁₄ H ₂₀ O ₂	—	—	—	+	+	+	+	+	+
M6	222.125 6	9.82	羟基化	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	—	—	—	—	+	+	+	+	+
M7	224.104 9	5.87	去甲基化+双羟基化	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	—	—	+	+	+	+	+	+	+
M8	236.104 9	10.30	去甲基羧酸	C ₁₃ H ₁₆ O ₄	+	+	+	—	+	+	+	+	+
M9	238.120 5	6.90	双羟基化	C ₁₃ H ₁₈ O ₄	—	—	+	+	+	+	+	+	+
M10	248.141 2	11.71	乙酰化	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	—	—	+	—	+	—	+	+	+
M11	254.115 4	11.33	氧化	C ₁₃ H ₁₈ O ₅	—	—	—	—	—	+	+	+	+
M12	286.087 5	3.43	磺酸化	C ₁₃ H ₁₈ O ₅ S	—	—	+	—	—	—	—	—	—
M13	302.082 4	8.91	羟基化+磺酸化	C ₁₃ H ₁₈ O ₆ S	—	—	—	—	+	—	+	+	+
M14	309.139 9	5.22	半胱氨酸结合物	C ₁₃ H ₁₇ O	—	—	—	—	—	—	—	+	+
M15	313.134 8	14.06	牛磺酸结合物	C ₁₅ H ₂₃ NO ₄ S	+	+	+	—	—	—	+	+	+
M16	382.162 8	15.31	葡萄糖醛酸	C ₁₉ H ₂₆ O ₈	+	+	+	—	—	—	+	+	+
M17	398.157 7	7.32	葡萄糖醛酸化脱水	C ₁₉ H ₂₆ O ₉	—	+	+	—	—	+	+	+	+

“+” 代表存在此化合物; “—” 代表不存在此化合物

“+” represents the compounds existing; “—” stands for absent compounds

时间在 10 min 左右, 布洛芬在 12 min 左右, 分离度良好, 保留时间适宜, 故采用吡哌美辛作为内标物。

SZD 对布洛芬药动学参数的影响研究结果表明, 与临床等效量(低剂量组)SZD 合用后, 表观清除率降低, 血药浓度降低, 表观分布容积变小, 半衰期延长, AUC 值升高, 生物利用度提高, 说明 SZD 与布洛芬合用后影响了布洛芬的体内吸收, 对于效应的影响有待深入研究。与高剂量 SZD 合用后, 表观清除率升高, 血药浓度降低, 表观分布容积变小, 半衰期缩短, AUC 值变小。为揭示 SZD 与布洛芬合用后生物效应的可能变化提供了参考。

药物代谢反应即药物的生物转化, 是指药物在生物体内发生的有机化学反应。生物转化的产物称为代谢物。外源性物质在体内的代谢大致分为两相反应, I 相生物反应是官能团导入反应, 主要包括氧化、还原和水解反应, 使药物的极性增大, 其中 90% 为氧化反应^[16-17]; II 相生物反应是结合反应, 包括葡萄糖醛酸苷化、硫酸酯化、谷胱甘肽结合等。体内尿苷二磷酸葡萄糖氧化生成葡萄糖醛酸基团, 其活化形式是尿苷二磷酸- α -D-葡萄糖醛酸, 然后通过转移酶将活化的葡萄糖醛酸基团结合到含有羟基、氨基、羧基或巯基的药物分子上。布洛芬与 SZD 合用后, 粪便中的 I 相羟基化、降解反应等增加, II 相代谢中乙酰化、羟基硫酸化反应等增加; 血浆中 I 相去甲基化、羟基化等反应增加, II 相代谢中乙酰化、硫酸酯化反应等增加; 尿液中代谢产物变化不大。可见, 两药合用后布洛芬在体内的代谢转化较为复杂, 可能引起多种药物代谢酶的活性变化, 其代谢产物的多样化对于药效、毒性的影响值得深入研究和探讨。

参考文献

- [1] 范本冲. 临床中西药联合应用浅析 [J]. 临床合理用药, 2012, 5(3B): 85-86.
- [2] Ohnishi M, Yonekawa Y, Nakasako S, *et al.* Studies on interactions between traditional herbal and western medicines I: Effects of Sho-SeiryuTo on the pharmacokinetics of Carbanazepine in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 1999, 22(5): 527-532.
- [3] Nishimura N, Naora K, Hirano H, *et al.* Effects of Sho-Saiko-To (Xiao Chai Hu Tang), a Chinese traditional medicine, on the gastric function and absorption of tolbutamide in rats [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2001, 121(2): 153-159.
- [4] Mu Y, Zhang J N, Zhang S M, *et al.* Traditional Chinese medicines Wu Wei Zi (*Schisandra chinensis* Baill) and Gan Cao (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) activate Pregnane X receptor and increase warfarin clearance in rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 316(3): 1369-1377.
- [5] 徐红梅. 少腹逐瘀汤治疗少女原发性痛经 36 例 [J]. 中国中医急诊, 2008, 17(8): 1151-1152.
- [6] 张凤瑞. 少腹逐瘀汤临床应用及药理研究概述 [J]. 中成药, 1994, 16(7): 47-48.
- [7] 叶效兰, 汪 晖, 乐 江, 等. 少腹逐瘀汤对子宫的解痉和抗炎作用 [J]. 中国医院药学杂志, 2002, 22(6): 329-332.
- [8] 宿树兰, 段金廛, 王团结, 等. 少腹逐瘀汤对寒凝血瘀大鼠模型血液流变性及卵巢功能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(12): 14-34.
- [9] 张 晶, 孙翠兰. 少腹逐瘀汤在妇科临床中的应用 [J]. 中国自然医学杂志, 2002, 4(2): 109-122.
- [10] 李根区. 布洛芬治疗原发性痛经的临床观察 [J]. 中国实用医药, 2011, 6(9): 161-162.
- [11] 徐红玲, 李国武. 中西医结合治疗原发性痛经 66 例 [J]. 中医临床研究, 2010, 2(5): 77-78.
- [12] 刘 洋, 胡连栋, 唐 星. 川芎挥发油中藁本内酯在大鼠体内的药动学研究 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 228-230.
- [13] 陆林玲, 束 艳, 钱大玮, 等. 大鼠灌胃四逆散提取物后血浆、尿液、粪便、胆汁中主要代谢产物的鉴定 [J]. 药学报, 2011, 46(11): 1374-1379.
- [14] Neal M D. Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1998, 34(2): 101-154.
- [15] 杨 春, 贺文义, 孔 漫, 等. 用固相萃取核磁共振氢谱研究大鼠尿液中 R(-)-布洛芬光活代谢产物 [J]. 药学报, 2000, 35(11): 843-846.
- [16] Rudy A C, Bardley J D, Ryan S L, *et al.* Variability in the disposition of ibuprofen enantiomers in osteoarthritic patients [J]. *Ther Drug Monit*, 1992, 13(5): 337-344.
- [17] 邹玲莉, 李秋莎, 韩国柱, 等. 外源性磷酸肌酸在大鼠体内的药代动力学和代谢处置 [J]. 药学报, 2011, 46(1): 75-80.