丹墨胶囊对泼尼松在大鼠体内药动学的影响Δ

韦炳华*,唐　蕾#,杨　倩,李瑞明,任　斌(中山大学附属第一医院,广州　510080)

中图分类号　R285　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408(2014)27-2497-04
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2014.27.01

摘　要　目的:研究丹墨胶囊对泼尼松在大鼠体内药动学的影响。方法:12只SD大鼠随机均分为单用丹墨胶囊(864 mg/kg)组、联合用药(864 mg/kg丹墨胶囊+42 mg/kg醋酸泼尼松)组。采用高效液相色谱(HPLC)法检测血浆中泼尼松、泼尼松龙的质量浓度。色谱柱为CC 250/4.6 NUCLEODUR 100-5C_{18}(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-水(A,含0.2%H_3PO_4,55∶45,*V*/*V*)-乙腈(B),梯度洗脱,检测波长为240 nm,柱温为40 ℃,流速为1.0 ml/min。用WinNonlin4.2程序计算主要药动学参数,并进行统计分析。结果:泼尼松、泼尼松龙回归方程分别为$y=2.092x-0.042\ 6$($r=0.999\ 8$)、$y=1.730\ 9x+0.005\ 5$($r=0.999\ 5$)。泼尼松、泼尼松龙质量浓度均在10～5 000 ng/ml范围内与其峰面积和内标峰面积比值呈良好线性关系。联合用药组泼尼松的$AUC_{0\sim2.5\ h}$和c_{max}均明显小于单用丹墨胶囊组($P<0.01$或$P<0.05$);联合用药组泼尼松龙的c_{max}明显大于单用丹墨胶囊组($P<0.05$)。结论:864 mg/kg丹墨胶囊能加快泼尼松向泼尼松龙转化,提高泼尼松的疗效。

关键词　泼尼松;泼尼松龙;丹墨胶囊;药动学;高效液相色谱法

Effects of Danmo Capsule on Pharmacokinetics of Prednisone in Rats

WEI Bing-hua, TANG Lei, YANG Qian, LI Rui-ming, REN Bin (The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE: To study the effects of Danmo capsule on the pharmacokinetics of prednisone in rats. METHODS: 12 SD rats were randomly divided into Danmo capsule group (864 mg/kg, single group), drug combination group (864 mg/kg Danmo capsule+42 mg/kg prednisone). The concentrations of prednisone and prednisolone in plasma were determined by HPLC. The determination was performed on CC 250/4.6 NUCLEODUR 100-5C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase A consisted of methanol-water (containing 0.2% H_3PO_4, 55∶45, *V*/*V*) and mobile phase B consisted of acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 240 nm and column temperature was 40 ℃. Main pharmacokinetic parameters were calculated by using WinNonlin4.2 program and analyzed statistically. RESULTS: The regression equation of prednisone and prednisolone were $y=2.092x-0.042\ 6$ ($r=0.999\ 8$) and $y=1.730\ 9x+0.005\ 5$ ($r=0.999\ 5$). There was sound linear relationship between the concentrations of prednisone and prednisolone and peak area, peak area ratio of internal standard. The c_{max} and $AUC_{0\text{-}2.5\ h}$ of prednisone in drug combination group were significantly lower than in single group ($P<0.01$, $P<0.05$); the c_{max} value of prednisolone in drug combination group was significantly higher than Danmo Capsule group ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Danmo capsule (864 mg/kg) can speed up the conversion of prednisone to prednisolone, and improve therapeutic efficacy.

KEYWORDS　Prednisone; Prednisolone; Danmo capsule; Pharmacokinetics; HPLC

丹墨胶囊是中山大学附属第一医院肾脏病研究所叶任高教授40余年治疗肾炎的中药经验方制成的院内制剂,对慢性肾炎、隐匿性肾炎、以肾虚为主的肾病综合征治疗效果显著;糖皮质激素是治疗肾病综合征、肾小球肾炎和狼疮性肾炎等的主要药物。临床报道[1-4]丹墨胶囊与糖皮质激素合用治疗肾脏疾病,能明显提高糖皮质激素的治疗效果,减少激素的使用量,并减少激素的不良反应。但是,丹墨胶囊对激素产生影响的机制尚不明确。为此,笔者考察了丹墨胶囊对泼尼松在大鼠体内药动学的影响,探讨可能发生的药动学相互作用,以为临床两药合用提供实验依据。

1　材料

1.1　仪器

1515型高效液相色谱仪,包括600型低压梯度泵、717型自动进样器、2489型紫外检测器、Millennium32色谱工作站(美国Waters公司);XW-80A型旋涡混合器(上海医科大学仪器厂);3K18型高速冷冻离心机(美国Sigma公司);AG-45型电子天平(瑞典Mettler Toledo公司);Milli-Q型超纯水装置(美国Millipore公司)。

1.2　药品与试剂

丹墨胶囊(中山大学附属第一医院制剂室,批号:101003,规格:0.4 g/粒);醋酸泼尼松(广东华南药业集团有限公司,批号:110205,规格:5 mg/片);羧甲基纤维素钠(美国Sigma-Aldrich公司,批号:MKAA1662);泼尼松、泼尼松龙、地塞米松对照品(美国Sigma公司,批号分别为200-020-5、200-021-7、

Δ基金项目:广东省中医药局建设中医药强省科研课题(No. 20131145)

*主管药师,硕士。研究方向:药理学。电话:020-87755755-8419。E-mail:13660019657@163.com

#通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:药动学与临床药学。电话:020-62732266。E-mail:pharma_tl@163.com

200-003-9，纯度分别为98%、98%、95%）；乙腈、甲醇为色谱纯，水为超纯水，其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

清洁级SD大鼠12只，♂，体质量220～310 g，由广东省实验动物中心提供[实验动物使用许可证号：SCXK（粤）2008-0002]。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：CC 250/4.6 Nucleodur 100-5C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇-水（A，含0.2%H_3PO_4，55∶45，*V*/*V*）-乙腈（B），梯度洗脱（0～15 min，100% A；>15～18 min，100%A→20% A；>18～23 min，20% A；>23～28 min，20%A→100% A；>28～30 min，100% A）；检测波长：240 nm；柱温：40 ℃；流速：1.0 ml/min；进样量：10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取泼尼松和泼尼松龙对照品各10.0 mg，精密称定，置50 ml量瓶中，加乙腈溶解并稀释至刻度，得200 μg/ml的混合对照品工作液，再按梯度稀释至100、50、20、10、5、2、1、0.5、0.2、0.1、0.05、0.02、0.01 μg/ml系列质量浓度，得混合对照品溶液，于4 ℃贮藏，备用。

2.2.2 内标溶液的制备 取地塞米松对照品10.0 mg，精密称定，置50 ml量瓶中，加乙腈溶解并稀释至刻度，得200 μg/ml的内标工作液，再稀释成500 ng/ml质量浓度，得内标溶液，于4 ℃贮藏，备用。

2.2.3 质控样品的制备 分别吸取不同质量浓度的混合对照品溶液10 μl，置1.5 ml塑料离心管中，N_2吹干。加入空白血浆100 μl，涡旋30 s，制备质量浓度为4 500、250、15 ng/ml的质控样品（即高、中、低质量浓度的质控样品）。

2.3 血浆样品预处理

取待测大鼠血浆100 μl，置塑料离心管（1.5 ml）中，加入0.1 mol/L NaOH溶液20 μl，涡旋混合1 min，再加入600 μl乙酸乙酯，混匀，涡旋振荡1 min，以离心半径为13 cm、10 800 r/min离心10 min，精密移取上清液于另一干净1.5 ml离心管中，N_2吹干，残渣用20 μl纯乙腈复溶，涡旋1 min，以离心半径为13 cm、10 800 r/min离心5 min，进样测定。

2.4 方法学考察

2.4.1 方法专属性 分别取0.2 ml空白血浆、0.2 ml空白血浆+分析物对照品+内标、0.2 ml给药后大鼠血浆样品，按“2.3”项下方法处理样品，按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果表明，在本实验条件下，泼尼松和泼尼松龙与内标地塞米松能完全分离，没有明显的内生杂质峰干扰。泼尼松和泼尼松龙与内标地塞米松的保留时间分别为8.7、11.3、16.2 min。色谱见图1。

2.4.2 标准曲线的制备 按“2.2.1”项下方法制备混合对照品系列溶液，按“2.3”项下方法处理，按“2.1”项下色谱条件进样测定。以各对应指标成分的质量浓度（*x*）为横坐标，峰面积和内标峰面积比值（*y*）为纵坐标，进行线性回归，得泼尼松、泼尼松龙回归方程分别为$y=2.092x-0.042\ 6$（$r=0.999\ 8$）、$y=1.730\ 9x+0.005\ 5$（$r=0.999\ 5$）。结果表明，泼尼松和泼尼松龙质量浓度均在10～5 000 ng/ml范围内与其峰面积和内标峰面积比值呈良好线性关系。

2.4.3 精密度试验 按“2.2.1”项下方法制备高、中、低质量浓度的质控样品各5份，按“2.3”项下方法处理，按“2.1”项下色谱条件测定日内精密度（5次）、日间精密度（5 d）。结果，高、中、低质量浓度质控样品的日内、日间精密度RSD≤8.71%。精密度试验结果见表1。

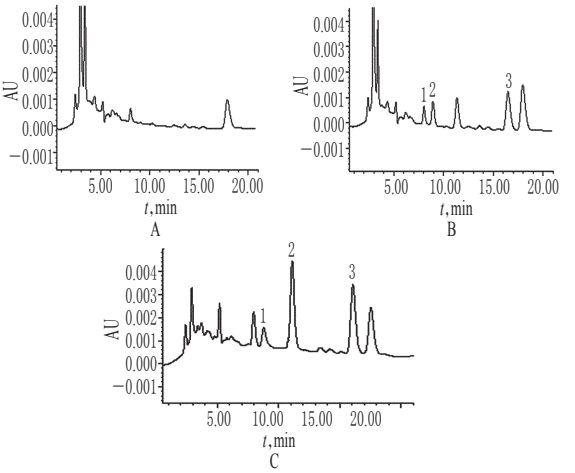

图1 高效液相色谱图

A：空白血浆；B：空白血浆+分析物对照品+内标；C：给药后大鼠血浆样品；1.泼尼松；2.泼尼松龙；3.地塞米松

Fig 1 HPLC chromatograms

A.blank plasma；B.blank plasma+reference substance+internal standard；C.plasma sample + internal standard；1.prednisone；2.prednisolone；3.dexamethasone

表1 精密度和方法回收率试验结果（*n*=5）

Tab 1 Results of I precision and recovery tests（*n*=5）

质控样品	质量浓度，ng/ml	RSD，%		回收率，%
		日内精密度	日间精密度	
泼尼松	15	3.11	7.27	85.24±2.65
	250	4.37	4.41	97.03±4.24
	4 500	3.53	1.36	94.08±3.32
泼尼松龙	15	7.22	7.28	88.91±6.42
	250	4.24	4.17	99.95±4.24
	4 500	1.43	1.33	94.08±1.35

2.4.4 方法回收率试验 按“2.2”项下方法制备高、中、低质量浓度的质控样品各5份，按“2.3”项下方法处理，按“2.1”项下色谱条件测定。目标分析物峰面积经标准曲线换算得质量浓度（*c*）。回收率（%）=（*c*/对应已知质量浓度）×100%。于同日内测定5次和连续5 d测定，计算日内、日间精密度。结果，方法回收率为85.24%～99.95%。方法回收率试验结果见表1。

2.4.5 准确度试验 按“2.2”项下方法制备高、中、低质量浓度的质控样品各5份，按“2.3”项下方法处理，按“2.1”项下色谱条件测得实际浓度。结果，高、中、低质量浓度质控样品的准确度在98.1%～101.6%之间，符合生物样品的检测要求。

2.4.6 稳定性试验 取“2.2”项下高、中、低质量浓度的质控样品各5份，置于室温贮藏（25 ℃）4 h后测定，考察血浆样品的短期稳定性；取“2.3”项下高、中、低质量浓度的标准质控样品各5份，冷冻贮藏于－20 ℃，7 d后测定，考察血浆样品的长期稳定性；取“2.3”项下高、中、低质量浓度的质控样品各5份，贮藏于－20 ℃，在室温中充分解冻，然后再次冷冻，每次间隔24 h，重复3个冻融周期后测定，考察血浆样品的3周期冻融稳定性。结果显示，血浆样品在室温放置、冰冻保存、反复冻融的条件下均有很好的稳定性。稳定性试验结果见表2。

2.5 药动学研究

表2　稳定性试验结果（n=5）

Tab 2　Results of stability test（n=5）

质控样品	质量浓度，ng/ml	室温，4 h		-20 ℃，冷冻-融解循环3次		-20 ℃，贮藏7 d	
		$\bar{x}\pm s$	RSD，%	$\bar{x}\pm s$	RSD，%	$\bar{x}\pm s$	RSD，%
泼尼松	15	15.12±0.47	3.11	14.20±0.53	3.73	14.31±0.96	6.99
	250	240.53±10.51	4.37	249.51±9.18	3.68	247.53±9.14	3.69
	4 500	4 549.80±160.61	3.53	4 649.29±165.05	3.55	4 586.31±120.62	2.63
泼尼松龙	15	14.97±1.08	7.21	13.43±0.70	5.21	14.98±0.93	6.21
	250	228.00±9.67	4.24	248.57±9.73	3.91	243.18±8.23	3.38
	4 500	4 594.88±65.71	1.43	4 674.55±87.41	1.87	4 656.56±129.92	2.79

12只♂SD大鼠随机均分为两组，即单用丹墨胶囊组（864 mg/kg）与联合用药组（864 mg/kg丹墨胶囊+42 mg/kg醋酸泼尼松），ig给药，每天1次，连续14 d。采血前ig醋酸泼尼松混悬液（42 mg/kg），于0、0.083、0.16、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、2.5、3、4、5、6、8 h由大鼠右颈总静脉采血0.3 ml（每次采血后补充同样体积含50 u/ml肝素的生理盐水），置1.5 ml肝素化的塑料离心管中，4 ℃下以离心半径为13 cm、5 000 r/min离心5 min，分离吸取上层血浆，-20℃贮藏，待测；大鼠血浆样品经“2.3”项下方法处理后进样测定。结果采用WinNonlin4.2程序处理，用非房室模型估算药动学参数。浓度-时间曲线见图2、图3；药动学参数见表3、表4。

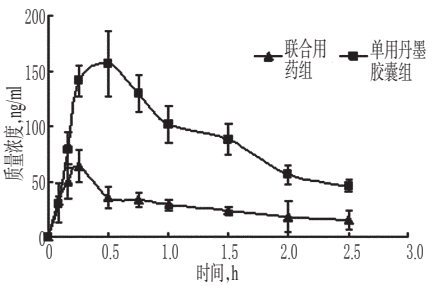

图2　大鼠体内泼尼松的浓度-时间曲线

Fig 2　The plasma concentrations-time curves of prednisone in rats

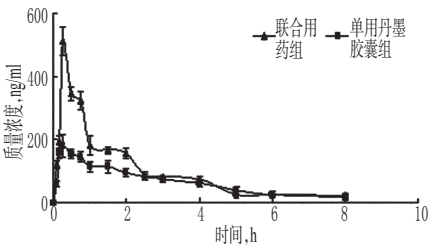

图3　大鼠体内泼尼松龙的浓度-时间曲线

Fig 3　The plasma concentrations-time curves of prednisolone in rats

表3　大鼠体内泼尼松的药动学参数（$\bar{x}\pm s$, n=6）

Tab 3　Pharmacokinetic parameters of prednisone in rats（$\bar{x}\pm s$, n=6）

参数	联合用药组	单用丹墨胶囊组
$t_{1/2}$，h	1.18±0.24	0.91±0.37
t_{max}，h	0.25±0.17	0.50±0.25
c_{max}，ng/ml	64.37±9.82*	156.91±12.59
$AUC_{0-2.5\ h}$，ng·h/ml	97.91±19.44**	257.26±33.58
$MRT_{0-2.5\ h}$，h	1.02±0.07	1.04±0.14

与单用丹墨胶囊组比较：*P<0.05，**P<0.01

vs. Danmo capsule group：*P<0.05，**P<0.01

表4　大鼠体内泼尼松龙的药动学参数（$\bar{x}\pm s$, n=6）

Tab 4　Pharmacokinetic parameters of prednisolone in rats（$\bar{x}\pm s$, n=6）

参数	联合用药组	单用丹墨胶囊组
$t_{1/2}$，h	1.54±0.23	1.59±0.40
t_{max}，h	0.25±0.08	0.25±0.08
c_{max}，ng/ml	511.67±26.27*	179.90±10.86
$AUC_{0-8\ h}$，ng·h/ml	824.38±175.44	706.26±129.80
$MRT_{0-8\ h}$，h	1.49±0.45	2.53±0.33

与单用丹墨胶囊组比较：*P<0.05

vs. Danmo capsule group：*P<0.05

3　讨论

糖皮质激素对肾脏疾病如肾病综合征、肾小球肾炎和狼疮性肾炎的治疗有非常重要的作用，常作为首选治疗药物，其代表药主要有泼尼松和甲基泼尼松龙。泼尼松极易在消化道吸收，其本身无生物活性，进入体内后经肝脏代谢转化为有活性的泼尼松龙从而发挥药理作用；泼尼松龙在肾脏代谢失活，转化为无活性的泼尼松排出体外。本研究表明，丹墨胶囊与醋酸泼尼松联合用药时，原药泼尼松c_{max}和AUC均明显减少，代谢产物泼尼松龙c_{max}明显升高。提示丹墨胶囊能加快泼尼松向泼尼松龙的转化，泼尼松转化成有活性代谢产物泼尼松龙的速度加快、药量增多，说明丹墨胶囊可提高泼尼松的吸收转化速度，使得血浆中泼尼松龙的c_{max}明显升高。实验证实，临床上两药合用，有利于提高泼尼松龙的药物质量浓度，增加激素疗效。

丹墨胶囊处方为丹参、墨旱莲、女贞子、益母草、生地黄、银花、茜草、地骨皮、全蝎。方中墨旱莲滋补肝肾、凉血止血，女贞子合用滋养肝肾之阴，为君药；丹参活血止血，生地黄清热凉血、养阴生津，两药辅助君药加强滋阴止血之效，为臣药；益母草活血祛瘀、利尿消肿，银花清热解毒、疏散风热，茜草清热凉血止血，地骨皮清退虚热，四药合用起佐助之力，为佐药；全蝎息风止痉，解毒通络，为使药。诸药合用，具滋肾养阴、清热凉血止血之功效。糖皮质激素的代谢主要是与CYP3A、糖蛋白（P-gp）转运体和11β-HSD有关，其中11β-HSD是其最重要的代谢酶。有研究证实[5-9]，丹墨胶囊中的君药墨旱莲提取物可抑制CYP1、CYP2及CYP3A活性，抑制P-gp转运；还有文献报道[10-14]，墨旱莲中的黄酮类成分木樨草素、芹菜素可抑制20α-HSD活性，芹菜素可抑制3β-HSD2活性，芹菜素、香叶木素可抑制17β-HSD活性，槲皮素可抑制11β-HSD活性，而20α-HSD、3β-HSD2、17β-HSD和11β-HSD具同源性。丹墨胶囊增加泼尼松在血中转化成泼尼松龙的转化速度和药量，可能与其君药墨旱莲主要活性成分影响了激素代谢酶有关，这需要深入地研究墨旱莲众多药理作用的内在物质基础[15]，阐述其

作用机制。

参考文献

[1] 阳晓,刘冠贤,黄光明,等.38年中西医结合治疗肾脏病的临床和实验研究[J].中山医科大学学报,2000,21(6):401.

[2] 尹金凤,叶任高.中西医结合治疗狼疮性肾炎198例疗效观察[J].江西医药,1999,34(1):26.

[3] 阳晓,裴超成,李幼姬.狼疮方配合免疫抑制剂治疗狼疮肾炎临床观察[J].中国医刊,2000,35(6):44.

[4] 郭群英,阳晓,汪涛.活动性狼疮性肾炎中西医结合治疗163例[J].中国中西医结合肾病杂志,2001,2(1):36.

[5] Foti RS, Wahlstrom JL, Wienkers LC. The in vitro drug interaction potential of dietary supplements containing multiple herbal components[J]. *Drug Metab Dispos*,2007,35(2):185.

[6] Kimura Y, Ito H, Ohnishi R, *et al*. Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity[J]. *Food Chem Toxicol*,2010, 48(1):429.

[7] Liu DY, Yang M, Zhu HJ, *et al*. Human pregnane X receptor-mediated transcriptional regulation of cytochrome P450 3A4 by some phytochemicals[J]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*,2006,35(1):8.

[8] Quintieri L, Palatini P, Nassi A, *et al*, Floreani M. Flavonoids diosmetin and luteolin inhibit midazolam metabolism by human liver microsomes and recombinant CYP 3A4 and CYP3A5 enzymes[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008,75(6):1 426.

[9] Kim HJ, Lee SB, Park SK, *et al*. Effects of hydroxyl group numbers on the B-ring of 5,7-dihydroxyflavones on the differential inhibition of human CYP 1A and CYP1B1 enzymes[J]. *Arch Pharm Res*,2005,28(10):1 114.

[10] Chan KF, Zhao Y, Chow TW, *et al*. Flavonoid dimers as bivalent modulators for p-glycoprotein-based multidrug resistance:structure-activity relationships[J]. *Chem Med Chem*,2009,4(4):594.

[11] Lacey M, Bohday J, Fonseka SM, *et al*. Dose-response effects of phytoestrogens on the activity and expression of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase and aromatase in human granulosa-luteal cells[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005,96(3/4):279.

[12] Brozic P, Kocbek P, Sova M, *et al*. Flavonoids and cinnamic acid derivatives as inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1[J]. *Mol Cell Endocrinol*,2009, 301(1/2):229.

[13] Wang MS, Shi H, Wang KS, *et al*. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in guinea pig kidney by three bioflavonoids and their interactions with gossypol [J]. *Acta Pharmacol Sin*,2002,23(1):92.

[14] Shimada H, Miura K, Imamura Y. Characteristics and inhibition by flavonoids of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity in mouse tissues[J]. *Life Sci*, 2006, 78 (25):2 931.

[15] 营大礼.墨旱莲化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J].中国药房,2008,19(36):2 876.

(收稿日期:2013-10-31 修回日期:2014-02-20)

国家卫生和计划生育委员会印发《关于开展爱婴医院复核的通知》

本刊讯 20世纪90年代以来,在世界卫生组织和联合国儿童基金会的倡导下,我国创建了7 300多所爱婴医院,占全球爱婴医院的1/3,营造了良好的爱婴爱母社会氛围。随着卫生计生事业改革与发展,妇女儿童健康需求不断增加,对爱婴爱母服务内容和方式提出了更高要求。为贯彻落实《中华人民共和国母婴保健法》《中国儿童发展纲要(2011-2020年)》等法律法规及有关规定,在总结前期爱婴医院创建工作经验基础上,国家卫生和计划生育委员会印发了《国家卫生计生委关于开展爱婴医院复核的通知》(国卫妇幼函〔2014〕185号)(以下简称《通知》),旨在通过爱婴医院复核,加强爱婴医院管理,不断提高母乳喂养率,逐步降低非医学指征剖宫产率,规范产科、儿科服务,强化质量安全,促进母婴健康。

《通知》要求地方各级卫生计生行政部门负责组织实施本行政区域内的爱婴医院复核、评估及日常监管工作,按照《爱婴医院标准(2014版)》对曾获得爱婴医院称号的医疗机构进行复核,对参与爱婴医院创建的医疗机构进行评估。对于达到标准要求的医疗机构,由省级卫生计生行政部门为其统一颁发"爱婴医院"牌匾,并公布本省(区、市)爱婴医院名单。国家卫生计生委负责监督指导全国爱婴医院复核和评估工作,汇总公布全国爱婴医院名单。

在建立爱婴医院管理长效机制方面提出:一是加强爱婴医院日常监管,对违反爱婴医院标准的医疗机构提出限期整改意见,整改不合格者,经省级卫生计生行政部门核准后取消其爱婴医院称号;二是爱婴医院称号有效期为3年,期满前3个月地方各级卫生计生行政部门按程序再次组织新一轮的爱婴医院复核工作。上级卫生计生行政部门应对下级卫生计生行政部门的复核结果进行抽查,如发现与实际情况不符,上级卫生计生行政部门有权变更下级卫生计生行政部门的复核结果。

《通知》包括4个附件:《爱婴医院复核方案》明确了复核对象、标准、周期、程序和各级职责;《爱婴医院标准(2014版)》明确复核标准、指标、内容、检查方法和评分标准;《助产机构爱婴指南(2014版)》主要是为具有助产技术服务的医疗机构提升服务能力和水平提供参考;《爱婴医院牌匾制作说明图》明确"爱婴医院"牌匾的材质和规格,由各省(区、市)卫生计生行政部门统一颁发。