

甘草酸和甘草次酸对芍药苷在大鼠体内药动学参数的影响

刘 卉¹, 单进军^{1,2,3}, 康 安^{1,2,3}, 恽 菲¹, 陈乐天^{1,2,3}, 张 雯¹, 狄留庆^{1,2,3*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046

2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210046

3. 南京市中药微丸产业化工程技术研究中心, 江苏 南京 210029

摘要: 目的 研究甘草酸及其代谢产物甘草次酸对芍药中主要活性成分芍药苷在大鼠体内药动学特征的影响, 探索芍药与甘草配伍用药的合理性。方法 大鼠单独 ig 给予芍药苷或分别与甘草酸、甘草次酸联合用药, 于不同时间点采集血样, LC-MS 测定芍药苷血药浓度, 建立药物浓度-时间曲线, 采用 DAS2.1.1 软件计算、分析药动学参数。结果 甘草酸能减小芍药苷 C_{max} 、 t_{max} , 降低芍药苷 AUC; 甘草次酸能增加芍药苷 C_{max} 、 t_{max} , 显著提高芍药苷 AUC。结论 甘草提高芍药苷生物利用度可能与甘草酸的代谢产物甘草次酸的作用相关。

关键词: 甘草酸; 甘草次酸; 芍药苷; 药动学; 生物利用度

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)12-1610-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.12.017

Effects of glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid on *in vivo* pharmacokinetic parameters of paeoniflorin in rats

LIU Hui¹, SHAN Jin-jun^{1,2,3}, KANG An^{1,2,3}, YUN Fei¹, CHEN Le-tian^{1,2,3}, ZHANG Wen¹, DI Liu-qing^{1,2,3}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

3. Nanjing Engineering and Technology Research Center of Traditional Chinese Medicine Pellets, Nanjing 210029, China

Abstract: Objective To explore the potential effects of glycyrrhizic acid and its active metabolite glycyrrhetic acid on the *in vivo* pharmacokinetic parameters of paeoniflorin in rats, and to investigate the rationality of the compatibility of *Paeonia lactiflora* and *Glycyrrhizae Radix et Rhizome*. **Methods** After the ig administration of paeoniflorin alone or with glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid respectively, blood samples were collected at different time points and assayed by LC-MS, and the plasma concentration-time profiles of paeoniflorin were established. The pharmacokinetic parameters were calculated and analyzed with DAS2.1.1 software. **Results** Glycyrrhizic acid could reduce the C_{max} , t_{max} , and AUC of paeoniflorin, while glycyrrhetic acid could increase the parameters. **Conclusion** *Glycyrrhizae Radix et Rhizome* could increase the bioavailability of paeoniflorin through the activity of glycyrrhetic acid which is the active metabolite of glycyrrhizic acid.

Key words: glycyrrhizic acid; glycyrrhetic acid; paeoniflorin; pharmacokinetics; bioavailability

芍药甘草汤具有解痉、镇痛、镇静、解热、抗氧化等作用。有关其配伍机制研究多有报道, 其中大多集中在活性成分及其药效学相互影响方面。芍药甘草汤组方虽简单, 但活性成分相当复杂, 甘草中的皂苷类物质具有抗炎、免疫调节、保肝、抗病毒、抗肿瘤等作用, 是甘草常与其他中药配伍后产

生解毒增效、调和诸药功效的物质基础^[1-3]。芍药苷为芍药的主要有效成分, 具有解痉镇痛、抗炎、抗应激性溃疡、扩张冠脉血管、抗急性心肌缺血等作用^[4]。芍药苷生物利用度较低, 甘草配伍芍药可提高芍药苷在大鼠体内的生物利用度^[5]。由于甘草的成分复杂, 其影响芍药苷的体内代谢过程的具体成

收稿日期: 2012-11-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81273655); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(ysxk-2010); 江苏高校优势学科建设工程资助项目开发课题(2011ZYX3-001、002、0077); 江苏省“青蓝工程”中药复方新型给药系统研究科技创新团队支持计划[(2008)30号]

作者简介: 刘 卉(1987—), 女, 2010 年硕士研究生, 研究方向为中药新剂型、新技术应用与评价。

*通信作者 狄留庆 Tel: (025)85811230 E-mail: diliuqing@hotmail.com

分及作用环节尚不清楚,甘草酸及其体内生物转化的活性产物甘草次酸对芍药苷生物利用度的影响也鲜见报道。本实验通过比较大鼠单独 ig 芍药苷及其分别与甘草酸、甘草次酸配伍 ig 给药后芍药苷药动学参数的变化,探讨甘草酸与甘草次酸对芍药苷生物利用度的影响,为进一步研究芍药与甘草体内代谢过程的相互影响及其机制,阐明此药对配伍的合理性提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

芍药苷原料药,陕西森弗生物技术有限公司,批号 20081113,质量分数为 98.0%;甘草酸,四川省维克奇生物科技有限公司,批号 20101113,质量分数为 98.0%;甘草次酸,南京泽朗制药有限公司,批号 20101112,质量分数 98.0%。芍药苷对照品(供定量测定用),批号 110736-200934,栀子苷对照品(供定量测定用),批号 110749-200810,均由中国药品生物制品检定所提供;乙腈、甲酸(色谱纯),Merck 公司;水为重蒸水;其他试剂均为分析纯;高纯度液氮,南京大学。

1.2 动物

SD 大鼠,雄性,体质量 180~220 g,由南京中医药大学实验动物中心提供,合格证号为 SCXK(沪)2007-0005。

1.3 仪器

Agilent 1200 LC-MS 联用仪(包括真空脱气机、四元梯度泵、自动进样器、电喷雾离子源、Chem station 色谱工作站),美国安捷伦公司;BP211D 型电子分析天平,德国 Satorius 公司;TGL-16MC 高速冷冻离心机,成都一科仪器设备有限公司;微量移液器、涡旋混合仪,北京中科科仪仪器有限公司;DCY-24S 可调式氮吹仪,青岛海科仪器有限公司。

2 方法与结果

2.1 药液的制备

精密称取芍药苷原料药 75 mg,加入 0.2% CMC-Na 水溶液 15 mL 溶解,即得芍药苷灌胃液。精密称取芍药苷 75 mg,甘草酸 62.50 mg(以芍药与甘草生药比 1:1 折算),加入 0.2% CMC-Na 水溶液 15 mL 溶解,即得甘草酸配伍芍药苷的灌胃液。精密称取芍药苷 75 mg,甘草次酸 35.75 mg,加入 15 mL 0.2% CMC-Na 水溶液溶解,即得甘草次酸配伍芍药苷的灌胃液。

2.2 分组与给药

SD 大鼠实验前适应性喂养 2 d,给药前禁食 14 h,不禁水,给药后 2 h 内禁水,全程禁食。将大鼠随机分为对照组、芍药苷组、甘草酸+芍药苷组、甘草次酸+芍药苷组,每组 6 只。另外 3 组大鼠 ig 给予“2.1”项下配制的相应药液 10 mL/kg(即芍药苷 50 mg/kg,甘草酸 41.67 mg/kg,甘草次酸 23.83 mg/kg),给药 1 次(剂量按照人和动物体表面积折算的等效剂量比值折算)。

2.3 血样采集与处理

于给药后 5、10、20、30、45、60、90、120、180、240、360、480、600、1 440 min 各组大鼠眼眶取血,对照组眼眶取血得空白血浆,5 000 r/min 离心 6 min,取上清置-80 °C 冰箱保存备用。

2.4 芍药苷的测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(50 mm×4.6 mm, 1.8 μm);流动相为甲醇-0.05% 甲酸水溶液(23:77),等度洗脱;体积流量 0.2 mL/min;进样量 5 μL;柱温 25 °C。

2.4.2 质谱条件 API-ES 离子源, SIM 模式,正离子检测,干燥气体积流量 10 L/min,温度 350 °C,雾化气压力 241.15 kPa,毛细管压力 3 000 Pa。检测对象: *m/z* 503.20 定量检测栀子苷, *m/z* 411 定量检测芍药苷。

2.4.3 对照品溶液的制备 取芍药苷对照品适量,精密称定,加甲醇超声溶解,定容后制成 0.50 mg/mL 的储备液,于 4 °C 保存。临用前,取对照品储备液适量,先用甲醇稀释成 0.050 mg/mL,再按倍数稀释法稀释至所需质量浓度。

2.4.4 内标(IS)溶液的制备 取栀子苷适量,精密称定,加甲醇超声溶解,定容后制成 9.7 mg/mL 的储备液,于 4 °C 保存。临用前,加甲醇稀释成 9.7 mg/mL,即得。

2.4.5 血浆样品制备 大鼠眼眶取血约 250 μL,置于肝素化离心管中,5 000 r/min 离心 6 min。精密吸取含药血浆 100 μL 置另一离心管中,精密加入 9.7 μg/mL 内标溶液 10 μL,涡旋 90 s 使内标与血浆混匀,再加入乙腈 320 μL,涡旋 120 s 至蛋白沉淀完全,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液至离心管中,于 37 °C 水浴下氮气吹干,残渣加入 100 μL 流动相甲醇-0.05% 甲酸水(23:77),涡旋 90 s,12 000 r/min 离心 5 min,离心后取上清液注入 HPLC-MS 分析。

2.4.6 方法学考察

(1) 专属性试验 取空白血浆, 空白血浆+芍药苷+内标, 芍药苷组血浆, 甘草酸+芍药苷组血浆, 甘草次酸+芍药苷组血浆各6份, 按“2.4.5”

项下方法处理, 分别进样, 按上述色谱、质谱条件测定。如图1所示, 芍药苷、内标栀子苷与血浆中蛋白杂峰、内源性等其他物质均能很好的分离, 具有良好的专属性。

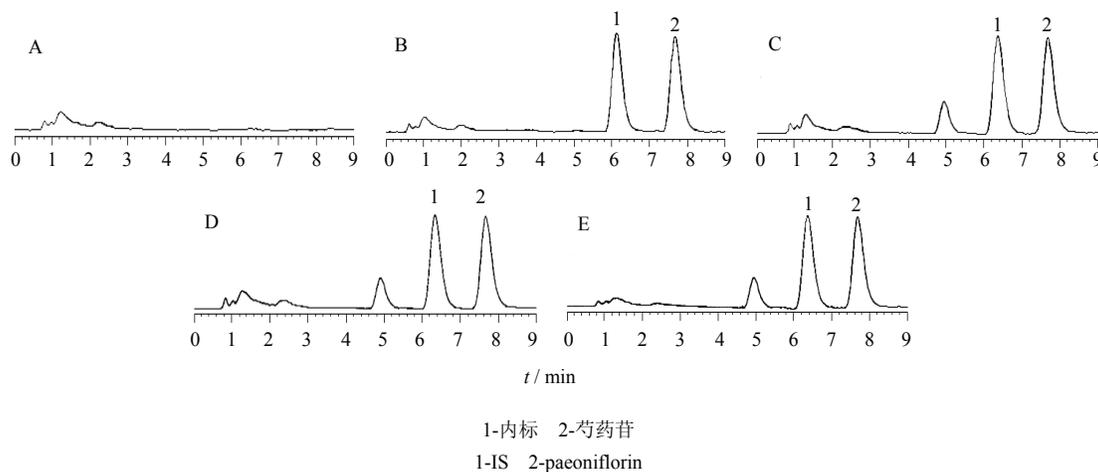


图1 空白血浆 (A)、空白血浆+芍药苷+内标 (B)、芍药苷组血浆样品+内标 (C)、甘草酸+芍药苷组血浆样品+内标 (D)、甘草次酸+芍药苷组血浆样品+内标 (E) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank plasma (A), blank plasma + paeoniflorin + IS (B), and plasma samples treated with paeoniflorin + IS (C), glycyrrhizic acid + plasma samples treated with paeoniflorin + IS (D), and glycyrrhetic acid + plasma samples treated with paeoniflorin + IS (E)

(2) 基质效应 取“2.3”项下对照组空白血浆, 沉淀蛋白后分别加入高、中、低3个质量浓度(207.5、51.875、10.375 ng/mL)的芍药苷对照品溶液及内标各6份, 其响应值与相同质量浓度芍药苷对照品的甲醇溶液比较, 比值分别为106.00%、92.58%、96.32%, 处于90%~110%。

(3) 线性关系及检测限试验 取芍药苷储备液及大鼠空白血浆, 按倍数稀释法制成芍药苷质量浓度分别为18.75、207.5、103.75、51.875、20.75、10.375、5.1875 ng/mL的含药血浆样品, 按“2.4.5”项下方法处理后分析。以血浆中芍药苷的质量浓度(X)对芍药苷与内标的峰面积比值(Y)进行加权最小二乘回归, 得血浆中芍药苷的标准曲线方程为 $Y=0.0005X+0.0025$, 线性范围5.1875~518.75 ng/mL, r 为0.9996, 检测限为5.1875 ng/mL。

(4) 精密度试验 取芍药苷储备液及大鼠空白血浆, 按倍数稀释法制成低、中、高3个质量浓度(10.375、51.875、207.5 ng/mL)样品各6份, 按“2.4.5”项下方法处理, 取上清液进行分析, 考察日内精密度。各样品每天测定1次, 连续测定3次, 考察日间精密度。结果芍药苷的日内精密度 RSD 分别为

5.06%、7.35%、1.46%; 日间精密度 RSD 分别为4.36%、7.21%、2.12%, 所得结果均小于15%。

(5) 稳定性试验 配制低、中、高3个质量浓度(207.5、51.875、10.375 ng/mL)的样品各5份, 分别在-20℃冷冻条件存放7d, 反复冻融3次, 室温放置24h, 测定, 考察色谱峰峰面积比值一致性。结果芍药苷量均为原始量的90.3%~102.8%, 表明含芍药苷血浆样品在7d内稳定。为保证测定过程中芍药苷处于稳定的状态, 确保实验结果的准确性, 应在样品处理之后尽快进行测定。

(6) 回收率试验 将低、中、高3个质量浓度(207.5、51.875、10.375 ng/mL)的芍药苷对照品溶液加入空白血浆中, 制得样品各6份, 按“2.4.5”项下方法处理后测定, 测得提取回收率分别为(85.52±4.25)%、(83.88±3.28)%、(84.35±5.13)%。

2.5 药动学研究

取“2.3”项下血浆样品, 将测得的血药浓度-时间数据以 DAS2.1.1 程序经计算机拟合, 以统计矩模型求算芍药苷在大鼠体内的各项药动学参数。芍药苷及其配伍甘草酸或甘草次酸后, 芍药苷在大鼠体内的药动学参数见表1, 其平均血药浓度-时间曲线见图2。结果表明, 甘草酸、甘草次酸配伍芍

表1 甘草酸及甘草次酸对芍药苷在大鼠体内药动学参数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 1 Effects of glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid on *in vivo* pharmacokinetic parameters of paeoniflorin in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	芍药苷	甘草酸+芍药苷	甘草次酸+芍药苷
C_{max}	$ng \cdot mL^{-1}$	233.86 ± 13.97	$162.72 \pm 14.62^{**}$	$367.68 \pm 84.19^*$
t_{max}	min	36.00 ± 8.22	$20.00 \pm 0.00^{**}$	42.00 ± 6.71
$t_{1/2}$	min	170.60 ± 197.06	51.38 ± 27.22	199.35 ± 151.20
AUC_{0-1440}	$\mu g \cdot min \cdot L^{-1}$	$25\ 786.59 \pm 3\ 237.01$	$18\ 706.51 \pm 3\ 902.93^{**}$	$38\ 732.91 \pm 8\ 672.46^*$
$AUC_{0-\infty}$	$\mu g \cdot min \cdot L^{-1}$	$26\ 787.93 \pm 2\ 832.68$	$18\ 880.04 \pm 4\ 101.66^{**}$	$39\ 726.22 \pm 8\ 742.82^*$
MRT	min	89.67 ± 4.04	91.92 ± 26.30	111.88 ± 10.15
CL	$L \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$	1.88 ± 0.20	$2.76 \pm 0.62^*$	$1.32 \pm 0.32^*$

与芍药苷组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs paeoniflorin group

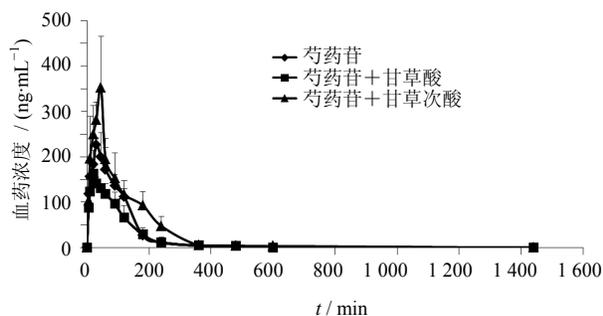


图2 不同配伍 ig 给药后芍药苷的药时曲线 ($n = 6$)

Fig. 2 Concentration-time curves of paeoniflorin with various compatibility after ig administration ($n = 6$)

药苷后, 芍药苷的主要药动学参数有显著变化, 甘草酸能够减小芍药苷的 C_{max} 、 t_{max} , 降低芍药苷 AUC; 甘草次酸能够增加芍药苷的 C_{max} 、 t_{max} , 显著提高芍药苷 AUC。

3 讨论

本实验首先考察了经乙腈、醋酸乙酯、甲醇 3 种试剂处理的血浆样品的芍药苷提取率, 结果表明, 选用乙腈为蛋白沉淀剂时芍药苷提取效率最大, 检测干扰较少, 因此采用乙腈沉淀蛋白。采用 HPLC-MS 联用技术, 建立了快速、简便测定芍药苷血药浓度的方法, 通过选择性监测样品和内标的分子离子峰进行定量, 具有很高的专属性。此方法灵敏度高、重复性好、操作简便、结果准确, 符合生物样品分析要求。

甘草主要活性成分甘草酸口服给药后在肠道转化为甘草次酸而被吸收, 本实验比较了甘草酸、甘草次酸对芍药苷大鼠体内药动学的影响, 结果表明甘草酸可减小芍药苷的 C_{max} 、 t_{max} , 降低芍药苷

AUC; 甘草次酸增加芍药苷 AUC。有文献报道芍药苷为 P-糖蛋白 (P-gp) 的底物^[6], 而甘草酸对 P-gp 有一定的诱导作用^[7], 因此甘草酸可能竞争性抑制芍药苷的吸收从而降低芍药苷的生物利用度; 而甘草次酸对 P-gp 具有一定的抑制作用^[7-9], 能促进芍药苷的吸收, 进而能显著增加其生物利用度。

甘草酸在甘草中的量较高, 甘草次酸的量较低, 但进入体内后, 甘草酸在肠道即可转化为甘草次酸, 因此尽管甘草酸降低了芍药苷的生物利用度, 但进入体内后, 起主导作用的是甘草次酸, 这与甘草配伍芍药可以提高芍药苷在大鼠体内生物利用度的结论^[10]相一致。基于吸收与代谢环节的甘草酸、甘草次酸对芍药苷药动学的影响机制值得深入探讨。

参考文献

- [1] Yuan W K, Bai F, Yang B, *et al.* Extraction and purification methods of glycyrrhizic acid [J]. *Chin J Pharm*, 2002, 33(7): 362-364.
- [2] 刘陶世, 赵新慧, 段金殿, 等. 芍药甘草汤总苷抗炎镇痛作用的配伍研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2007, 18(6): 427-430.
- [3] 于力, 张蕾, 郝志宏, 等. 甘草甜素对大鼠肾小球硬化早期的防护作用 [J]. *中草药*, 2010, 41(2): 250-255.
- [4] 黄国钧. *中药药理学* [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003.
- [5] 杨秀伟, 郝美荣. *中药成分代谢分析* [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003.
- [6] 杨洋, 李文兰, 季宇彬, 等. 八珍汤中芍药苷、阿魏酸肠吸收影响因素研究 [J]. *哈尔滨商业大学学报*, 2010, 26(4): 385-389.

- [7] 刘艳文. 甘草酸对中毒剂量下马钱子碱代谢动力学影响及解毒机制研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2010.
- [8] 何丹. 甘草提取物及其三种主要有效成分对 Caco-2 细胞膜上 P-gp 功能和表达的影响 [D]. 长沙: 中南大学, 2010.
- [9] Nabekura T, Yamaki T, Ueno K, *et al.* Inhibition of P-glycoprotein and multidrug resistance protein 1 by dietary phytochemicals [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, 62(5): 867-873.
- [10] 王文萍, 王垂杰, 谷松, 等. 芍药甘草汤配伍意义的药动学研究 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2009, 11(3): 382-387.