

# 甘草酸对大鼠体内硝苯地平药动学的影响<sup>Δ</sup>

毛俊<sup>1,2\*</sup>,朱项羽<sup>1</sup>,夏宏光<sup>1</sup>,王志豪<sup>1</sup>,刘慧茹<sup>2</sup>,江海燕<sup>1</sup>,金涌<sup>1#</sup>(1.安徽医科大学药学院抗炎免疫药物教育部重点实验室,合肥 230032;2.合肥市第二人民医院药学部,合肥 230026)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)21-2942-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.21.13

**摘要** 目的:研究甘草酸对大鼠体内硝苯地平药动学的影响。方法:将大鼠随机分为实验组和对照组,每组10只。实验组大鼠灌胃甘草酸5 mg/kg,对照组灌胃等量的0.5%羧甲基纤维素钠溶液,每日1次,连续给药14 d,第14天灌胃30 min后,2组大鼠均灌胃硝苯地平3 mg/kg,并于灌胃硝苯地平前与灌胃后0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8、12、24 h眼内眦静脉丛采血0.5 mL。采用高效液相色谱法,以地西洋为内标,测定其中硝苯地平的浓度;色谱柱为ODS-C<sub>18</sub>;流动相为甲醇-水(62:38, V/V, 乙酸调pH为4.5);流速为1.0 mL/min;柱温为30 ℃;检测波长为238 nm;进样量为20 μL。使用Winonlin 6.0软件计算药动学参数, *t*-检验进行统计分析。结果:实验组和对照组大鼠体内硝苯地平的主要药动学参数 *t*<sub>max</sub> 分别为(1.40 ± 0.15)、(1.50 ± 0.01) h; *c*<sub>max</sub> 分别为(0.15 ± 0.03)、(0.29 ± 0.09) mg/L; *t*<sub>1/2</sub> 分别为(4.70 ± 1.17)、(5.20 ± 1.38) h; AUC<sub>0-24 h</sub> 分别为(1.00 ± 0.10)、(1.89 ± 0.37) mg·h/L; AUC<sub>0-∞</sub> 分别为(1.00 ± 0.16)、(1.98 ± 0.32) mg·h/L; MRT 分别为(6.76 ± 0.64)、(6.60 ± 1.36) h。与对照组比较,实验组大鼠体内硝苯地平的 *c*<sub>max</sub>、AUC<sub>0-24 h</sub>、AUC<sub>0-∞</sub> 均明显降低,差异具有统计学意义(*P* < 0.05)。结论:甘草酸可能会降低硝苯地平在大鼠体内的生物利用度,两药联用时建议增加硝苯地平的剂量以达到有效的血药浓度。

**关键词** 甘草酸;硝苯地平;地西洋;高效液相色谱法;药动学;大鼠

## Effects of Glycyrrhizic Acid on Pharmacokinetics of Nifedipine in Rats

MAO Jun<sup>1,2</sup>, ZHU Xiangyu<sup>1</sup>, XIA Hongguang<sup>1</sup>, WANG Zhihao<sup>1</sup>, LIU Huiru<sup>2</sup>, JIANG Haiyan<sup>1</sup>, JIN Yong<sup>1</sup> (1.Key Lab of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2.Dept. of Pharmacy, Hefei Second People's Hospital, Hefei 230026, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effects of glycyrrhizic acid on the pharmacokinetics of nifedipine in rats. METHODS: Rats were randomly divided into experimental group and control group, with 10 rats in each group. Experimental group was given glycyrrhizic acid 5 mg/kg and control group was given 0.5% CMC-Na (sodium carboxymethylcellulose) solution, once a day, for 14 consecutive days. On 14th day after 30 min of intragastric administration, both groups were given nifedipine 3 mg/kg intragastrically. Blood samples 0.5 mL were collected from intraocular vein plexus before and at 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12 and 24 h after intragastric administration. The concentration of nifedipine was determined by HPLC using diazepam as internal standard. The determination was performed on ODS-C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of methanol-water (62:38, V/V, pH adjusted to 4.5 with acetic acid) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 30 ℃. The detection wavelength was set at 238 nm, and sample size was 20 μL. The pharmacokinetic parameters were calculated with Winonlin 6.0 software, and statistical analysis was performed by *t*-test. RESULTS: The main pharmacokinetic parameters of the experimental group and the control group were as follows as *t*<sub>max</sub> was (1.40 ± 0.15), (1.50 ± 0.01) h; *c*<sub>max</sub> was (0.15 ± 0.03), (0.29 ± 0.09) mg/L; *t*<sub>1/2</sub> was (4.70 ± 1.17), (5.20 ± 1.38) h; AUC<sub>0-24 h</sub> were (1.00 ± 0.10), (1.89 ± 0.37) mg·h/L; AUC<sub>0-∞</sub> was (1.00 ± 0.16), (1.98 ± 0.32) mg·h/L; MRT was (6.76 ± 0.64), (6.60 ± 1.36) h, respectively. Compared with control group, *c*<sub>max</sub>, AUC<sub>0-24 h</sub> and AUC<sub>0-∞</sub> of nifedipine were decreased significantly in experimental group, with statistical significance (*P* < 0.05). CONCLUSIONS: Glycyrrhizic acid can reduce the bioavailability of nifedipine in rats. It is suggested that the dosage of nifedipine should be increased in order to achieve effective blood concentration.

**KEYWORDS** Glycyrrhizic acid; Nifedipine; Diazepam; HPLC; Pharmacokinetics; Rat

硝苯地平是当今治疗心脑血管疾病最常见的一线

Δ 基金项目:安徽省自然科学基金项目(No.1808085MH284)

\* 主管药师,硕士研究生。研究方向:临床药理。电话:0551-62203647。E-mail:2973311@qq.com

# 通信作者:教授,博士。研究方向:药剂学与药物分析。电话:0551-65167769。E-mail:jinyong@ahmuedu.cn

药物,主要用于高血压、心律失常、心绞痛等病的治疗。该药在发挥药效的同时,常常会引起转氨酶升高、黄疸等药物性肝损伤<sup>[1]</sup>。甘草是一种历史悠久、应用广泛的中药,在方剂中常作为使药,有“无甘草不成方”之说,在中医经方《伤寒论》一百一十三方中,多达七十七方含有

甘草<sup>[2]</sup>。甘草中的主要活性物质甘草酸不仅在心血管疾病的防治方面具有非常重要的作用<sup>[3]</sup>,还是常规的保肝药物,临床上常用来治疗硝苯地平类药物引起的肝损伤<sup>[4]</sup>。本实验初步探讨了甘草酸对大鼠体内硝苯地平药动学的影响,以期为临床合理应用甘草酸制剂治疗硝苯地平引起的肝损伤提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-20 高效液相色谱仪(包括 LC-20A 真空在线脱气机、LC-20AT 四元泵、CTO-10 AS 柱温箱、SPD-M20 A 检测器)和 AU120 电子天平均购自日本 Shimadzu 公司;5427R 离心机(德国艾本德公司);VX-III 涡旋混合器(北京踏锦科技有限公司);BF-2000 氮气吹干仪(北京八方世纪科技有限公司);HPX-9052MBE 恒温烘箱(上海博讯医疗设备厂)。

### 1.2 药品与试剂

地西洋对照品(内标,美国 Sigma-Aldrich 公司,批号:439-14-5,纯度:99.7%);甘草酸对照品和硝苯地平对照品(阿拉丁公司,批号:1405-86-3、21829-25-4,纯度:99.73%、99.76%);甲醇(国药集团化学试剂有限公司,批号:67-56-1,色谱级);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,批号:C8621-25g)和肝素钠(批号:9041-08-1)均购自北京索莱宝科技有限公司;乙酸乙酯和环己烷均为分析纯,水为超纯水。

### 1.3 动物

SD 大鼠,SPF(无特定病原体)级,♀,2月龄,体质量(210±20)g,由安徽医科大学实验动物中心提供,动物使用许可证号:SYXK(皖)2017-006。所有大鼠饲养在温度、湿度、灯光受调控的房间,给予正常饮食,在标准环境饲养2周后开始实验。

## 2 方法与结果

### 2.1 分组与给药

将大鼠随机分成对照组和实验组,每组10只。实验组大鼠灌胃甘草酸5 mg/kg<sup>[5]</sup>(溶剂为0.5% CMC-Na 溶液,给药剂量按临床成人常用剂量换算),对照组大鼠灌胃等量的0.5% CMC-Na 溶液,每日1次,连续14 d。第13天夜里,将大鼠禁食过夜(晚上10:00—第2天白天实验前),但是自由饮水,于第14天灌胃30 min后,实验组和对照组大鼠同时灌胃硝苯地平3 mg/kg<sup>[6]</sup>(溶剂为0.5% CMC-Na 溶液,给药剂量按临床成人常用剂量换算)。

### 2.2 样品采集

分别于给予硝苯地平前和给药后0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8、12、24 h 从眼内眦取血0.5 mL,置于预先加入肝素钠的试管中,4℃下3 000 r/min 离心10 min, -20℃冷冻保存备用。

## 2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取硝苯地平对照品3.0 mg,置于10 mL 量瓶中,以甲醇溶解并稀释至刻度,混匀,得到质量浓度为0.3 mg/mL 的硝苯地平贮备液。准确称取甘草酸对照品10.0 mg,置于10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,混匀,得到质量浓度为1.0 mg/mL 的甘草酸贮备液。上述溶液均置于冰箱2~8℃保存备用。

2.3.2 内标溶液的制备 精密称取地西洋对照品1.00 mg,置于100 mL 量瓶中,用适量甲醇溶解并稀释至刻度,混匀,得到质量浓度为10.0 μg/mL 的内标贮备液。精密量取内标贮备液1.00 mL,置于100 mL 量瓶中,用适量甲醇溶解并稀释至刻度,混匀,得到质量浓度为100 ng/mL 的内标溶液,置于冰箱2~8℃保存备用。

## 2.4 血浆样品的处理

精密量取待测血浆样品200 μL,置于1.5 mL EP 管中,加入10 μL 内标溶液(100 ng/mL),加入乙酸乙酯-环己烷混合液(3:1, V/V)<sup>[7]</sup>1 mL 萃取,涡旋1 min,4 000 r/min 离心5 min。取上清液0.8 mL,置于干净的EP管中,55℃水浴加热,N<sub>2</sub>吹干,并将残余物用100 μL 流动相复溶,取20 μL 上清液进样分析。

## 2.5 色谱条件

色谱柱:ODS-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(62:38, V/V, 乙酸调pH为4.5);流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长:238 nm;进样量:20 μL。

## 2.6 专属性试验

取空白血浆、加硝苯地平的空白血浆、大鼠灌胃后12 h 时的给药血浆各1份,按照“2.4”项下方法处理后(其中空白血浆不加内标溶液),再按照“2.5”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果显示,硝苯地平和地西洋的保留时间分别为9.6、5.9 min,血浆里的杂质不影响硝苯地平的测定,硝苯地平和地西洋可以完全分离,峰形良好,可见本方法具有专属性高、分离度好的特点,可以准确测定硝苯地平的浓度。色谱图见图1。

## 2.7 线性关系与定量下限的考察

将200 μL 空白血浆,置于离心管中,加入10 μL 内标溶液(100 ng/mL),再分别加入50 μL 不同质量浓度的硝苯地平对照品溶液至终浓度分别为20、40、80、160、320 ng/mL。再按照“2.4”项下方法处理后(不再加内标溶液),按“2.5”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以硝苯地平质量浓度为横坐标(x),以硝苯地平与内标峰面积比值的均数为纵坐标(y),采用加权最小二乘法进行线性回归分析,得回归方程为 $y = 0.011x - 0.0066$  ( $r = 0.9994$ ),硝苯地平的检测质量浓度在20~320 ng/mL 线性范围内与峰面积呈良好的线性关系。以信噪比值=10 确定的定量下限为5 ng/mL。

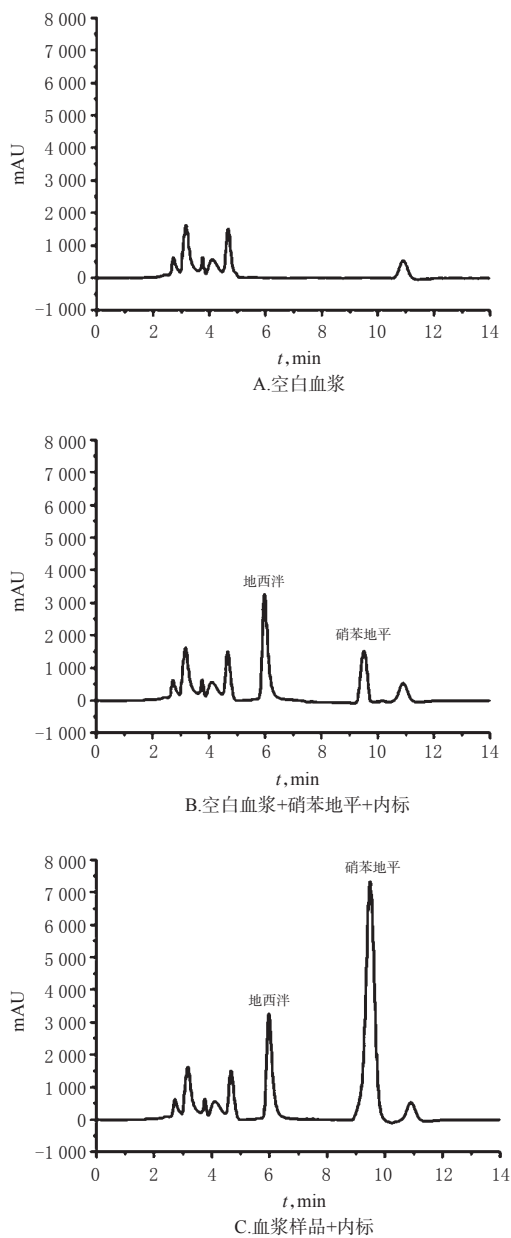


图1 高效液相色谱图  
Fig 1 HPLC chromatogram

### 2.8 精密度、准确度、稳定性试验

将200 μL空白血浆,分别加入不同质量浓度的硝苯地平对照品溶液至终浓度分别为20、80、320 ng/mL。按照“2.4”项下方法处理后,按“2.5”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,每个浓度同日内测定5次,考察日内精密度;连续测定3 d考察日间精密度;以测得值与真实值的比值计算准确度。分别放置0、1、2、3、6、12、24 h后再按照“2.4”项下方法处理,然后按“2.5”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,考察稳定性。结果显示,20、80、320 ng/mL血浆样品的日内、日间精密度的RSD和稳定性的RSD均小于10% ( $n=5$ 或 $n=7$ ),准确度在80%~120%之间,RSD均小于10% ( $n=5$ ),表明本方法精密度、准确度、稳定性考察均符合相关要求。精密度、准确

度、稳定性结果见表1。

表1 精密度、准确度、稳定性结果(%)

Tab 1 Results of precision, stability, recovery and accuracy tests(%)

理论浓度,ng/mL	精密度( $n=5$ )		准确度( $n=5$ )	准确度RSD( $n=5$ )	稳定性RSD( $n=7$ )
	日内RSD	日间RSD			
20	3.83	7.03	82.35	4.68	7.89
80	2.17	5.89	94.38	3.18	7.71
160	2.87	2.48	101.05	5.12	7.92

### 2.9 药动力学研究

取“2.2”项下各采血时间点的血浆,按“2.4”项下方法处理后,再按“2.5”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,代入回归方程计算硝苯地平浓度,绘制2组大鼠体内硝苯地平的药-时曲线。再采用Winonlin 6.0软件通过非房室模型分析计算药动力学参数。其中, $t_{max}$ 和 $c_{max}$ 是实测值, $AUC_{0-24h}$ 由前24 h每个时间点的血药浓度通过梯形法计算得到, $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-24h} + c_{24h}/\lambda$  ( $c_{24h}$ 是最后24 h的血药浓度, $\lambda$ 是末端消除速度常数,即药-时曲线末端直线部分的斜率), $t_{1/2} = 0.693/\lambda$ ,平均滞留时间(MRT) =  $AUMC/AUC$  (AUMC是指一阶距药-时曲线下面积)。采用SPSS 13.0软件对两组大鼠的药动力学参数进行 $t$ 检验。两组大鼠体内硝苯地平的药-时曲线见图2,药动力学参数比较见表2。

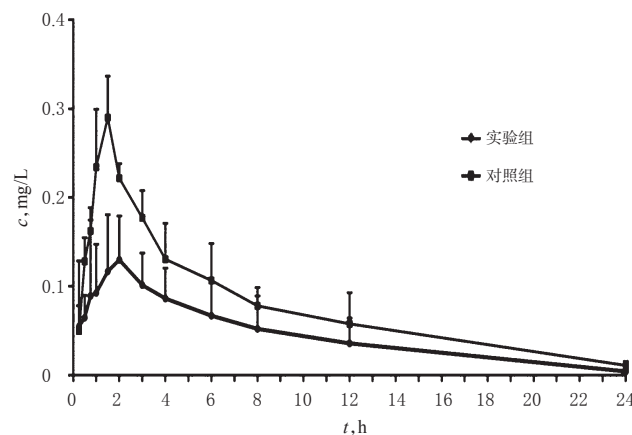


图2 两组大鼠体内硝苯地平的药-时曲线( $n=10$ )  
Fig 2 Plasma concentration-time curves of nifedipine in rats of two groups( $n=10$ )

由表2结果可见,两组大鼠体内硝苯地平的 $t_{max}$ 、 $t_{1/2}$ 、MRT差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。而实验组大鼠体内硝苯地平的 $c_{max}$ 、 $AUC_{0-24h}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 均明显低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

当今社会,临床上中西药结合治疗已成常态。中西药联用可以发挥各自优势,取长补短,提高疗效,但也会不可避免地因两者发生相互作用而引起一系列不良反应,其中代谢酶的改变是最主要因素之一。硝苯地平

表2 两组大鼠体内硝苯地平的药动学参数比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Tab 2 Comparison of pharmacokinetic parameters of nifedipine in rats of two groups( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

参数	对照组	实验组
$t_{max}$ ,h	1.50±0.01	1.40±0.15
$c_{max}$ ,mg/L	0.29±0.09	0.15±0.03*
$t_{1/2}$ ,h	5.20±1.38	4.70±1.17
AUC <sub>0-24h</sub> ,mg/L·h	1.89±0.37	1.00±0.10**
AUC <sub>0-∞</sub> ,mg/L·h	1.98±0.32	1.00±0.16**
MRT,h	6.60±1.36	6.76±0.64

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

Note: vs. control group,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

为肝脏主要代谢酶细胞色素P<sub>450</sub>(CYP)3A4的底物<sup>[8]</sup>,而甘草酸会诱导CYP3A4的活性<sup>[9]</sup>,所以甘草酸有可能会对硝苯地平的药动学产生影响。

有文献[10]记载大鼠的性别对CYP3A4酶影响很大,考虑到雌鼠的CYP3A4代谢与人类更接近,所以本实验均以雌性的SD大鼠作为药动学研究的模型。实验结果表明,与对照组比较,硝苯地平联用甘草酸后,硝苯地平的AUC<sub>0-24h</sub>降低34.6%、AUC<sub>0-∞</sub>降低34.7%,并伴随着 $c_{max}$ 的轻度降低(22.8%),差异均具有统计学意义( $P<0.05$ ),提示硝苯地平在体内的代谢过程发生改变,血药浓度出现明显下降,这可能与甘草酸是CYP3A4的诱导剂有关。Lee KJ等<sup>[11]</sup>使用平衡透析法进行了蛋白质结合研究,发现加入甘草酸后,主要影响了硝苯地平与人血清白蛋白(HSA)的结合,从而使硝苯地平与血清的结合发生位移,血清 $K$ 值降低。然而甘草酸的使用并没有使硝苯地平的 $t_{max}$ 、 $t_{1/2}$ 、MRT发生明显变化,这可能与甘草酸对机体CYP系统影响较为复杂有关。CYP2C是CYP家族重要的一员,约占大鼠CYP总量的55%,参与很多药物代谢。张瑛瑛<sup>[12]</sup>指出甘草酸对大鼠CYP3A4、CYP2B1、CYP1A2等具有诱导作用,对人的CYP2C19活性却没有影响。但甘草次酸却可以明显抑制CYP2C9和CYP2C19的活性。所以笔者猜测, $t_{max}$ 、 $t_{1/2}$ 、MRT未发生明显变化的原因可能是甘草酸对CYP2B1、CYP1A2等其他酶也产生了影响,也可能是甘草酸灌胃给药后在大鼠体内生成了主要的活性成分甘草次酸,而甘草次酸进一步影响了其他代谢酶的活性。

总之,甘草酸改变了硝苯地平的代谢,对硝苯地平

的药动学产生了影响。提示两者配伍时应适当增加硝苯地平的用量,使之维持有效的血药浓度。笔者后期将进一步考察更长诱导时间、更大剂量甘草酸可能对硝苯地平带来的影响,而且由于甘草酸对机体CYP代谢酶系统影响较为复杂,甘草酸影响硝苯地平的药动学机制也有待于继续深入研究。

### 参考文献

- [1] 杨忠萍.我院心内科硝苯地平治疗心绞痛致不良反应256例报告分析[J].现代医学与健康研究电子杂志,2018,2(7):152-153.
- [2] 孙燕.浅谈甘草在《伤寒论》中的应用[J].辽宁中医杂志,2006,33(9):1173.
- [3] 刘萍,王平.甘草化学成分及其对心血管系统影响的机理[J].世界科学技术(中医药现代化),2011,13(1):96-98.
- [4] 陈鲁琦.复方甘草甜素治疗药物性肝炎的疗效观察[J].中国药房,2003,14(8):483.
- [5] 叶花,王嘉琛,刘培,等.甘草在不同配伍中及炮制前后甘草酸的含量变化研究[J].广州化工,2018,46(9):61-65.
- [6] HE JX, OHNO K, TANG J, et al. Da-Chaihu-Tang alters the pharmacokinetics of nifedipine in rats and a treatment regimen to avoid this[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2014, 66(11):1623-1630.
- [7] 徐玫.山奈酚对大鼠体内硝苯地平药动力学的影响[D].杭州:浙江大学,2005.
- [8] 张新慧,刘群,褚志杰,等.硝苯地平口服制剂药代动力学影响因素[J].药学研究,2016,35(8):475-478.
- [9] 刘星雨,吴娜,张娇,等.生、炙甘草对小鼠CYP3As及对雷公藤内酯醇解毒的比较[J].中成药,2014,36(12):2451-2457.
- [10] 孙钧安,韩学诚,夏宗玲.4种二氢吡啶类钙拮抗药对地塞米松诱导雌性大鼠CYP3A4酶活性的影响[J].中国药师,2014,17(12):2007-2010.
- [11] LEE KJ, PARK HJ, SHIN YH, et al. Effect of glycyrrhizic acid on protein binding of diltiazem, verapamil, and nifedipine[J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(9):978-983.
- [12] 张瑛瑛.甘草酸二铵对大鼠肝微粒体细胞色素P<sub>450</sub>酶含量及活性的影响[J].实用药物与临床,2016,19(3):280-282.

(收稿日期:2019-05-30 修回日期:2019-09-17)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——中文核心期刊,欢迎投稿、订阅