

大鼠灌服炙甘草汤后甘草次酸药动学研究

罗 雄^{1,3}, 胡瑞刚^{1,3}, 陈兰英^{1,3*}, 黄慧连^{1,2}, 王木兰^{1,3}, 龚 琴¹, 刘荣华^{1,2*}

1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

2. 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

3. 江西中医学院, 江西 南昌 330006

摘要: 目的 建立大鼠 ig 炙甘草汤后体内甘草次酸的 LC-MS/MS 测定方法。方法 采用醋酸乙酯沉淀蛋白处理血浆样品, 选用白藜芦醇为内标, 采用 LC-MS/MS 法测定, 色谱条件为 ORBAX SB-C₁₈ 反相色谱柱 (Agilent, 50 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 乙腈-水 (80:20, 含 0.2% 甲酸) 为流动相, 体积流量 0.2 mL/min, 柱温 30 °C。样品经电喷雾离子 (ESI) 源负离子化后, 通过 Agilent 6410 三重四级杆串联质谱仪, 采用多反应监测 (MRM) 对甘草次酸进行测定, 分别选用 *m/z* 469.4→425.4 和 227.1→143.0 作为甘草次酸和内标物白藜芦醇的检测离子对。结果 甘草次酸在 33.4~8 560.0 ng/mL 线性关系良好 ($R^2=0.997 1$), 日内 ($n=6$)、日间 ($n=6$) 精密度、稳定性 RSD 均小于 10%。甘草次酸高、中、低 3 个质量浓度平均提取回收率分别为 75.3%、78.2%、78.5%。在此方法下得到大鼠 ig 炙甘草汤后血浆中甘草次酸的药动学参数分别为 $t_{\max}=(8.00\pm 1.13)$ h, $C_{\max}=(811.02\pm 300.25)$ ng/mL, $AUC_{0-24}=(11 439.21\pm 3 367.36)$ ng/mL·h。结论 该方法灵敏、准确、快速、选择性高, 可用于甘草次酸血药浓度监测和药动学研究。

关键词: 炙甘草汤; 甘草次酸; 药动学; LC-MS/MS; 白藜芦醇

中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)08-1580-05

Pharmacokinetic study on glycyrrhetic acid in rats ig administrated by *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata Cum Melle Decoction*

LUO Xiong^{1,3}, HU Rui-gang^{1,3}, CHEN Lan-ying^{1,3}, HUANG Hui-lian^{1,2}, WANG Mu-lan^{1,3}, GONG Qin¹, LIU Rong-hua^{1,2}

1. The National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Materia Medica, Nanchang 330006, China

2. Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Nanchang 330004, China

3. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

Abstract: Objective To establish an LC-MS/MS method for determination of glycyrrhetic acid (GA) in plasma after ig administration of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata Cum Melle* (Zhigancao) Decoction in rats *in vivo*. **Methods** Treating plasma with ethyl acetate protein precipitation and taking reseedrol was used as the internal standard (IS), the residues were analyzed with LC-MS/MS system (Agilent ORBAX SB-C₁₈ RP column, 50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) with the mobile phase consisted of acetonitrile-water (80:20, 0.2% formic acid), flow-rate of 0.2 mL/min, and column temperature of 30 °C. Agilent 6410 triple quad mass spectrometer system with an electrospray ionization (ESI) source and negative ion mode was used as the detector in this study. Multi-reaction monitoring (MRM) was used to detect GA by using ion combinations of *m/z* 469.4→425.4 for GA and 227.1→143.0 for IS. **Results** The calibration curve showed good linear regression ($R^2 = 0.997 1$) within measurement ranges (33.4—8 560.0 ng/mL). Both the intra- and inter-day precision and variation RSD were less than 10%. The average recovery rates at low, medium, and high concentrations of GA were 75.3%, 78.2%, and 78.5%, respectively. Under these conditions, the pharmacokinetic parameters of GA in plasma of rats after ig administration of Zhigancao Decoction were $t_{\max}(8.00 \pm 1.13)$ h, $C_{\max}(811.02 \pm 300.25)$ ng/mL, and $AUC_{0-24}(11 439.21 \pm 3 367.36)$ ng/mL·h. **Conclusion** The method provides a sensitive, accurate, precise, and reliable analytical procedure for detecting GA in rat plasma and studying its pharmacokinetics.

Key words: *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata Cum Melle* (Zhigancao) Decoction; glycyrrhetic acid (GA); pharmacokinetics; LC-MS/MS; reseedrol

收稿日期: 2010-10-15

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划资助项目 (2006BAI08B04-10)

作者简介: 罗 雄, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药效及其作用机制研究。

*通讯作者 陈兰英 Tel: (0791)7119611 E-mail: clyxy2513@163.com

刘荣华 Tel: (0791)7119010 E-mail: rhliu@163.com

炙甘草汤出自《伤寒论》，由炙甘草、生地黄、人参、阿胶、麦冬、大枣等9味药材组成，是治疗“脉结代、心动悸”的经典名方。现代药理研究表明，炙甘草汤及其有效成分甘草酸、人参皂苷等能够明显拮抗各种化学和物理因素诱发的心律失常^[1-3]，能够明显延迟心肌触发活动的发生、降低心肌细胞的自律性和兴奋性^[4-6]。然而，迄今为止，国内外尚未见炙甘草汤活性成分的体内过程和药动学研究报道。有研究表明，甘草酸经肠道吸收后，受肠道菌群的影响，大部分以甘草次酸(glycyrrhetic acid, GA)的形式进入血液^[7]，甘草次酸的药理作用广泛^[8]，本课题组前期利用LC-MS/MS仅检测个别大鼠血浆中微量的甘草酸，不足以作为药动学研究指标。鉴于此，根据文献报道^[9-10]，本实验采用LC-MS/MS法，建立了大鼠血浆中甘草次酸的测定方法，并对其进行了药动学研究，本方法灵敏度高，专属性强，为炙甘草汤的深入研究奠定了良好的基础。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1200 液相色谱—Agilent 6410 三重串联四级杆质谱联用系统(美国, Agilent), Thermo IEC 高速离心机(Micromax RF)、BF—2000 氮气吹干仪(八方世纪)、XW—80A 漩涡混合器(上海青浦沪西仪器厂)、SZ—93A 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 试药

炙甘草汤原方药材均购于江西中医学院附属医院中药房，经江西中医学院刘荣华教授鉴定均符合《中国药典》2005年版标准，炙甘草汤按照传统工艺提取后浓缩为生药1.6 g/mL。甘草次酸(中国药品生物制品检定所，批号110823200401)，白藜芦醇(天津尖峰天然产物研究公司，批号G050804)。

1.3 试剂

乙腈、甲酸(色谱纯, Merck公司)，其他试剂均为分析纯，高纯度液氮(由南昌大学提供)。

1.4 动物

SD大鼠，雄性，体质量(260±20)g，由江西中医学院实验动物中心提供，动物质量合格证号为SCXK(沪)2008—0016。

2 LC-MS/MS分析

2.1 色谱条件和质谱条件

2.1.1 色谱条件 ORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(Agilent, 50 mm×2.1 mm, 1.8 μm)，柱温30℃，流动相为乙

腈-水(80:20, 含0.2%甲酸)，体积流量0.2 mL/min，进样量10 μL。

2.1.2 质谱条件 电喷雾(ESI)离子源，负离子模式，雾化压力275.792 kPa，离子源温度330℃，保护气流量10 L/min，毛细管电压3 500 V，裂解电压为110 V(甘草次酸)和130 V(白藜芦醇)，扫描模式为多反应监测(MRM)，甘草次酸 *m/z* 为469.4/425.4(M-COOH)，白藜芦醇为227.1/143(M-C₆H₁₂)。

2.2 对照品及内标溶液配制

2.2.1 对照品溶液配制 精密称取甘草次酸对照品2.14 mg置5 mL量瓶中，用甲醇配制成0.428 mg/mL储备液。取适量上述储备液用甲醇稀释成33.4、66.9、133.8、267.5、535.0、1 070.0、2 140.0、4 280.0、8 560.0 ng/mL的系列溶液，备用。

2.2.2 内标溶液的配制 精密称取白藜芦醇1.03 mg置500 mL量瓶中，用甲醇配制成2.06 μg/mL的内标溶液，备用。

2.3 血浆样品处理与测定

精密取血浆样品0.2 mL，加入2.06 μg/mL内标溶液0.1 mL，醋酸乙酯3 mL，涡旋振荡10 min，4 000 r/min离心10 min。吸取上清液，于40℃氮气吹干，残留物加0.2 mL乙腈-水(80:20, 含0.2%甲酸)，涡旋振荡5 min溶解，用0.22 μm微孔滤膜滤过，取10 μL滤液进样分析。

2.4 方法专属性考察

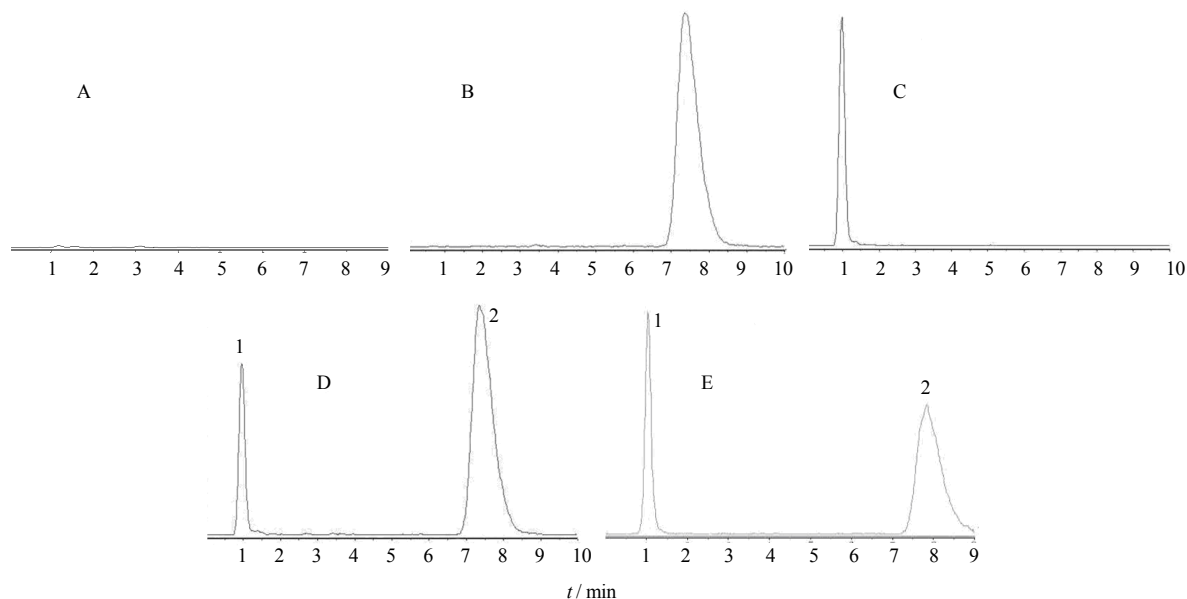
采用MRM方式。分别取空白大鼠血浆及大鼠给药后血浆样品0.2 mL，按“2.3”项操作处理，甘草次酸和内标白藜芦醇的保留时间分别为7.5、0.96 min。结果表明，专属性强、灵敏度高，分离效果良好，血浆中内源性物质无干扰，见图1。

2.5 线性关系考察

取空白血浆0.2 mL共9份，分别加入甘草次酸系列对照品溶液(33.4、66.9、133.8、267.5、535.0、1 070.0、2 140.0、4 280.0、8 560.0 ng/mL)和内标溶液各0.1 mL，按“2.3”项操作处理，进样10 μL，记录色谱图。以甘草次酸和内标物峰面积比值为纵坐标(*A*)，甘草次酸质量浓度(*C*)为横坐标，采用加权最小二乘法进行回归，权重系数为1/*C*²，求得回归方程为*A*=0.004 *C*+0.062，(*R*²=0.997 1)。甘草次酸在33.4~8 560.0 ng/mL线性关系良好。

2.6 提取回收率

取空白血浆0.2 mL，按“2.5”项下方法分别加入内标溶液0.1 mL和质量浓度为33.4、535.0、8 560.0



A-空白血浆 B-空白血浆加甘草次酸 C-空白血浆加内标 D-空白血浆加内标和甘草次酸 E-大鼠 ig 炙甘草汤后血浆样品加内标 1-内标 2-甘草次酸
A-blank plasma B-blank plasma spiked with GA C-blank plasma spiked with IS D-blank plasma spiked with IS and GA E-rat plasma after ig
administration of Zhigancao Decoction and spiked with IS 1-IS 2-GA

图 1 甘草次酸血浆样品的 LC-MS/MS 色谱图

Fig. 1 LC-MS/MS chromatograms of GA in rat plasma

ng/mL 的甘草次酸对照品溶液 0.1 mL 配制成低、中、高 3 个质量浓度的血浆样品各 5 个样本；另取空白血浆 0.2 mL，不加对照品溶液和内标溶液，按“2.5”项下方法操作，向获得的醋酸乙酯上清液中加入相应浓度的对照品溶液 0.1 mL 和内标 0.1 mL，涡旋混合，40 °C 氮气吹干，残留物加 0.2 mL 乙腈-水（80 : 20，含 0.2% 甲酸），涡旋振荡 5 min 溶解，0.22 μm 微孔滤膜滤过。以上 2 种方法处理的样品取 10 μL 进样分析，获得相应色谱峰面积（3 次测定的平均值）。以同一质量浓度两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率，甘草次酸在低、中、高 3 个质量浓度的提取回收率分别为 75.3%（RSD=7.5%）、78.2%（RSD=4.6%）、78.5%（RSD=3.2%），内标白藜芦醇的提取回收率为 86.1%（RSD=2.1%）。

2.7 精密度考察

取空白血浆 0.2 mL，分别加入内标溶液和质量浓度为 33.4、133.8、535.0、2 140.0、8 560.0 ng/mL 的甘草次酸对照品溶液 0.1 mL，每一质量浓度进行 6 个样本分析，按“2.5”项下方法进行样品处理，连续测定 3 d，求得方法精密度的 RSD，5 种质量浓度对照品溶液的日内精密度的 RSD 分别为 6.7%、5.4%、3.3%、2.5%、3.1%，日间精密度的 RSD 分

别为 7.9%、4.5%、5.3%、2.2%、2.7%，均符合生物样品分析方法指导原则的有关规定。

2.8 样品稳定性

取空白血浆 0.2 mL，加入低、中、高 3 个质量浓度（33.4、535.0、8 560.0 ng/mL）的甘草次酸对照品溶液 0.1 mL，涡旋混匀后，每个浓度的样品分别取 3 个样本在室温下放置 4 h、-20 °C 冰箱放置 1 个月和反复冻融 3 次后，加入内标溶液 0.1 mL，按“2.3”项操作处理，进样 10 μL，记录色谱图，考察样品的放置稳定性和冻融稳定性。另取空白血浆 0.2 mL，加入质量浓度分别为 33.4、535、8 560 ng/mL 的甘草次酸对照品溶液 0.1 mL 配制低、中、高 3 个质量浓度的样品各 3 个样本，于室温保存 24 h 后加入内标溶液 0.1 mL，按“2.5”项下方法分别测定。3 个质量浓度样品在室温下放置 4 h 所得 RSD 分别为 6.5%、2.3%、4.2%，反复冻融 3 次所得 RSD 分别为 8.6%、5.2%、3.6%，-20 °C 放置 1 个月所得 RSD 分别为 3.3%、1.7%、2.6%，经过处理后 24 h 所得 RSD 分别为 8.7%、5.6%、7.3%。结果表明甘草次酸血浆样品在室温条件下至少能稳定 4 h，在冰冻条件下至少能稳定 30 d；反复冻融 3 次并不影响血药浓度，经过处理后的血浆样品在室温条件下至少能稳定 24 h。

3 药动学研究

3.1 受试药物溶液的制备

炙甘草汤水煎液的制备:按炙甘草汤传统的煎煮工艺制备成水煎液,取药材(炙甘草 12 g, 生姜 9 g, 桂枝 9 g, 人参 6 g, 生地黄 50 g, 阿胶 6 g, 麦冬 10 g, 麻仁 10 g, 大枣 10 枚)加入适量的蒸馏水浸泡 0.5 h, 然后用武火加热, 待沸腾后再用文火煎煮 1 h, 重复 3 次, 合并 3 次水煎液, 加入阿胶烊化, 滤过, 浓缩至生药 2 g/mL, 于 4 °C 冰箱保存备用。

3.2 大鼠血浆样品的采集

5 只 SD 大鼠 ig 炙甘草汤水煎液(给药量为生药 30 g/kg)。给药后 5、15、30、45 min 和 1、1.5、2、3、4、6、8、12、24 h 眼眶后静脉取血 0.5 mL, 置肝素化的离心管中, 3 000 r/min, 离心 15 min 分离血浆, 取血浆于样品管中, -80 °C 冰箱保存待测。

3.3 药动学参数

大鼠 ig 给予炙甘草汤水煎液后, 血浆样品按“2.3”项下操作, 以当日的标准曲线计算各时间点样品中甘草次酸的质量浓度, 平均血药浓度-时间曲线见图 2, 主要药动学参数(采用药动学软件 DAS 2.0 计算)见表 1。

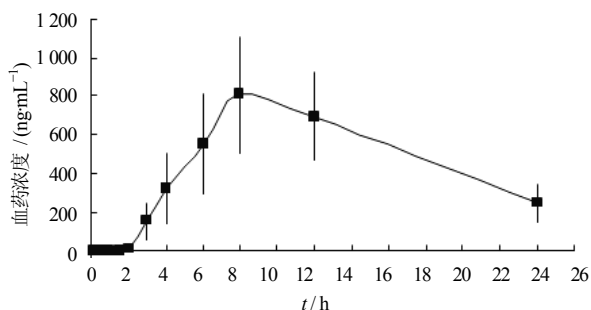


图 2 大鼠 ig 炙甘草汤后血浆中甘草次酸药-时曲线
Fig. 2 Mean GA concentration-time curve after ig administration of Zhigancao Decoction

4 讨论

4.1 质谱条件的优化

本实验比较了甘草次酸在电喷雾离子源 (ESI) 和大气压化学离子源 (APCI) 中的响应, 结果表明, ESI 源检测信号响应强度优于 APCI 源。对甘草次酸在正离子和负离子检测方式下的响应进行比较, 结果显示, 负离子检测较正离子信号强度大。采用 ESI 源负离子检测对甘草次酸和内标白藜芦醇进行一级全扫描, 甘草次酸和内标物的分子离子峰[M-H]⁻ m/z 分别为 469.4 和 227.1, 选择其为母离子进行二

表 1 大鼠 ig 炙甘草汤后甘草次酸的药动学参数
($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of GA in rats after ig administration of Zhigancao Decoction ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

参数	单位	甘草次酸
t_{max}	h	8.00 ± 1.13
C_{max}	ng·mL ⁻¹	811.02 ± 300.25
AUC ₀₋₂₄	ng·mL ⁻¹ ·h	11 439.21 ± 3 367.36
$t_{1/2}$	h	4.96 ± 2.07

级全扫描, 甘草次酸的主要碎片离子为 m/z 425.4 和 409.2, 前者响应值较高; 内标物的主要碎片离子 m/z 为 185 和 143, 后者响应值较高, 故选二者的主要离子对 m/z 469.4→425.4 和 227.1→143.0 为 MRM 分析的定量离子对。采用 MRM 较选择离子监测方式 (SRM) 具有更高的专属性和灵敏度。

4.2 内标物的选择

在内标物的选择过程中, 考察了与甘草次酸结构类似的熊果酸, 以及氧化白藜芦醇和白藜芦醇。结果表明, 白藜芦醇与待测物受内源性物质干扰及仪器波动等因素的影响相近, 色谱分离时间短, 出峰时间仅需 0.96 min, 且甘草次酸及白藜芦醇在 MRM 监测中信号无相互干扰, 最终选择白藜芦醇为内标。

4.3 检测指标的选取

甘草酸、人参皂苷、麦冬皂苷都是炙甘草汤中的有效成分, 但麦冬皂苷、人参皂苷 Rb₁ 和人参皂苷 Rg₁ 在炙甘草汤中的量太低, ig 给药后血浆中均无法检测到。而甘草酸为亲水性大分子, 在小肠中不易吸收, 仅少量通过主动转运方式进入血液, 因而在血浆中也不易检测到; 大部分甘草酸在小肠停留时, 受肠内菌群的作用水解成为甘草次酸, 甘草次酸脂溶性强, 易通过肠壁进入血液发挥作用^[1], 故本实验选用甘草次酸为指标成分。

5 结论

本研究采用 LC-MS/MS 法, 以白藜芦醇为内标, 以 ESI 为离子源, 通过 MRM 方式, 首次对大鼠 ig 炙甘草汤后血浆中甘草次酸进行了测定, 建立了炙甘草汤中甘草次酸的血药浓度检测方法, 同时考察了其药动学过程, 为炙甘草汤临床用药提供了实验依据。

参考文献

[1] 连晓媛, 陈 奇, 毕 明. 炙甘草汤抗心律失常实验研究 [J]. 中药药理与临床, 1993, 9(6): 1-3.

- [2] 陈兰英, 罗雄, 胡瑞刚, 等. 炙甘草汤对气血两虚心律失常大鼠血流动力学的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1438-1440.
- [3] 李兴高, 陈奇, 黄梦雨, 等. 炙甘草汤有效成分及其配伍对缺血再灌离体大鼠心脏触发活动及心肌损伤的影响 [J]. 中药药理与临床, 2003, 14(1): 6-9.
- [4] 陈兰英, 陈奇, 刘荣华, 等. 炙甘草汤有效成分人参总皂苷及其配伍对心肌生理特性的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(5): 332-336.
- [5] 陈兰英, 陈奇, 刘荣华, 等. 炙甘草汤及有效成分对组胺诱发离体豚鼠乳头肌触发活动及动作电位影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(1): 41-43.
- [6] 陈兰英, 陈奇, 刘荣华, 等. 炙甘草汤主要有效成分对心肌生理特性的影响 [J]. 中草药, 2001, 32(2): 134-136.
- [7] 黄鑫, 丁黎, 杨劲, 等. 高效液相色谱-质谱法研究甘草酸二铵胶囊在健康人体的药代动力学 [J]. 中国临床药理学杂志, 2006, 22(5): 365-368.
- [8] 张明发, 沈雅琴. 甘草酸及其苷元甘草次酸的糖皮质激素样作用 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(1): 33-35.
- [9] Lin Z J, Qiu S X, Wufuer A, et al. Simultaneous determination of glycyrrhizin, a marker component in *Radix Glycyrrhizae*, and its major metabolite glycyrrhetic acid in human plasma by LC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2005, 814: 201-207.
- [10] Zhao W J, Wang B J, Wei C M, et al. Determination of glycyrrhetic acid in human plasma by HPLC-MS method and investigation of its pharmacokinetics [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2008, 33: 289-294.
- [11] Akao T, Hayashi T, Kobashi K, et al. Intestinal bacterial hydrolysis is indispensable to absorption of 18 β -glycyrrhetic acid after oral administration of glycyrrhizin in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1994, 46: 135-139.

天津中草药杂志社开通网上在线投稿系统

天津中草药杂志社编辑出版的 4 种期刊《中草药》、*Chinese Herbal Medicines* (CHM, 中草药英文版)、《现代药物与临床》(原刊名《国外医药·植物药分册》)、《药物评价研究》(原刊名《中文科技资料目录·中草药》), 为提高稿件处理效率, 更好地为广大读者和作者服务, 中草药杂志社开通网上在线投稿系统。

1. 在线投稿请登陆天津中草药杂志社网站: <http://www.中草药杂志社.中国> 或 www.tiprpress.com 点击进入 4 刊网页, 在页面左侧有“作者登录”链接, 第一次登陆按操作说明注册后进行在线投稿; 作者可通过点击“作者登录”进行稿件查询。

2. 原则上不再采用电子邮件、纸质投稿。

衷心感谢广大读者、作者和编委对本刊长期以来的关心和支持!

天津中草药杂志社