

不同的,并且同一种氨基酸在脑的不同部位的含量也有很大差异。为什么要分析这9种氨基酸,因为这些氨基酸要么本身就是神经递质,如Glu、GABA、Gly、Asp和Tau,要么是代谢相关氨基酸,如Ser、Trp、Tyr、Gln,这些氨基酸与脑的功能密切相关。这就让人联想到氨基酸的变化和脑的不同功能相关,许多研究也证实了这个想法。如张虹等^[9]研究表明,脑外伤及重伤组脑脊液中兴奋性氨基酸明显升高。余东来等^[10]认为,海马、杏仁体、额叶的Glu、GABA、Gly、Asp和Tau对癫痫的发作与治疗也起着相当重要作用。抑郁症患者脑内GABA浓度明显偏低,而Glu和谷氨酸浓度则明显偏高^[11]。因此,研究脑组织中氨基酸类神经递质的含量可以了解脑的功能和神经精神系统疾患(如癫痫、帕金森综合症、脑损伤及抑郁等疾病)的发病机制,阐明抗惊药、抗癫痫药和抗抑郁药的作用机制。

总之,在本次实验中,建立了一个常规条件下同时测量9种氨基酸的方法,用这个方法测量了脑内6个部位的氨基酸含量,证实了脑内氨基酸分布的差异。这次研究为中枢神经系统的研究提供了一种有效的研究工具,同时为脑内氨基酸的分析提供数据参考。

REFERENCES

- [1] YANG P, LI X, NI J, et al. Alterations of amino acid level in depressed rat brain [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2014, 18(5): 371-376.
- [2] AVINO P, CAMPANELLA L, RUSSO M V. High-performance liquid chromatography intercomparative study for

- amino acid analysis in two tissues by PITC-and OPA-derivatizations [J]. Anal Lett, 2001, 34(6): 867-882.
- [3] SUN J L, DUAN S M, WANG J, et al. The method for the determination of amino acid neurotransmitters in brain by reverse phase HPLC system with the precolumn phthali aldehyde derivatization [J]. Jiangsu Pharm Clin Res(江苏药学与临床研究), 2002, 10(1): 16-18.
- [4] ZHANG L, YE C F, SHEN Q, et al. Improvement of high-performance liquid chromatography with fluorescence detection to measure amino acid neurotransmitters in the rat brain [J]. Acta Lab Anim Sci Sin(中国实验动物学报), 2011, 19(5): 378-379.
- [5] HEINRIKSON R L, MEREDIT S C. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenyl isothiocyanate [J]. Anal Biochem, 1984, 136(1): 65-74.
- [6] MA X L, MENG L, BATUR, et al. Determination of free amino acids in serum and urine by precolumn derivatization HPLC with PITC and AQC [J]. Amino Acids Biotic Resour(氨基酸和生物资源), 2012, 34(3): 19-24.
- [7] WU Q E, ZHENG L X, RUAN G H, et al. Determination of the amino acids in rat brain by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection [J]. Fudan Univ J Med Sci(复旦学报: 医学版), 2005, 32(3): 355-358.
- [8] HARSING L J, LAJTHA A, VIZI E S. A high performance liquid chromatography/electrochemical assay for glutamatergic neurotransmitters in the rat brain [J]. Biomed Chromatogr, 1989, 3(4): 183-185.
- [9] ZHANG H, ZHAI S D, LI J R, et al. Determination of excitatory amino acids in cerebrospinal fluid after cerebral injury and clinical significance [J]. Chin J Med Lab Sci(中华医学检验杂志), 1998, 21(6): 359-361.
- [10] SHE D L, GAO Y, SHEN G Y, et al. Effect of amino acid neurotransmitters on central nervous system diseases [J]. J MUC(Nat Sci Ed)(中央民族大学学报: 自然科学版), 2010, 19(2): 78-81.
- [11] SANACORA G, GUEORGUIEVA R, EPPERSON C N, et al. Subtype specific alterations of gamma -aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression [J]. Arch Gen Psychiatry, 2004, 61(7): 705-713.

收稿日期: 2014-11-25

甘草提取物对唑吡坦在大鼠体内的药动学影响

陈江飞, 徐萍*, 朱素燕, 徐涛, 张健波(宁波市第一医院, 浙江 宁波 315010)

摘要: 目的 研究甘草提取物对唑吡坦在大鼠体内药动学的影响。方法 12只大鼠随机分为对照组与甘草组,分别予生理盐水和甘草提取物(0.5 g·kg⁻¹, qd)7 d后唑吡坦灌胃给药,按时间点连续采样,采用HPLC-FLU测定血药浓度。计算其主要药动学参数,并进行统计学分析。结果 合用甘草后,唑吡坦的 t_{max} 显著缩短($P<0.05$), AUC_{0-8h} 、 $AUC_{0-\infty}$ 显著减小($P<0.05$), CL/F 显著增高($P<0.05$),而 C_{max} 和 $t_{1/2}$ 变化无统计学差异。结论 甘草提取物影响唑吡坦在大鼠体内的代谢,临床上两药合用应注意潜在的药物相互作用风险。

基金项目: 2013年浙江省医学会临床科研基金项目(2013ZYC-A68)

作者简介: 陈江飞,男,硕士,副主任药师 Tel: (0574)87085034
药师 Tel: (0574)87085034 E-mail: pxu2004@126.com

E-mail: chenjiangfei@163.com *通信作者: 徐萍,女,主任

关键词: 甘草; 唑吡坦; 药动学; 相互作用

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)07-0831-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.07.014

Effect of Licorice on Zolpidem Pharmacokinetics in Rats

CHEN Jiangfei, XU Ping*, ZHU Suyan, XU Tao, ZHANG Jianbo(Ningbo No.1 Hospital, Ningbo 315010, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of licorice on zolpidem pharmacokinetics in rats. **METHODS** Experimental rats were randomly divided into the control group and treatment group, which was administrated respectively with normal saline and extract of licorice. After pretreated with extract of licorice ($0.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, qd) for 7 d, zolpidem was given to the rats by intragastric administration. The plasma concentrations of zolpidem were determined by HPLC-FLU. Main pharmacokinetic parameters were calculated by statistical analysis. **RESULTS** After coadministering with licorice, the t_{\max} of zolpidem was markedly decreased ($P<0.05$). The $\text{AUC}_{0\rightarrow 8\text{h}}$ and $\text{AUC}_{0\rightarrow\infty}$ of zolpidem in treatment group were significantly lower than those in control group ($P<0.05$). And the CL/F was markedly decreased ($P<0.05$). There was no significant difference between the two groups of C_{\max} and $t_{1/2}$ ($P>0.05$). **CONCLUSION** Extract of licorice can affect the metabolism of zolpidem. So we should pay attention to the potential herb-drug interaction risk after coadministering with licorice and zolpidem in clinic.

KEY WORDS: licorice; zolpidem; pharmacokinetics; interaction

中药甘草药理作用多样、临床应用广泛,许多中药方剂和中成药含甘草,素有“十方九草”之称,同时也是现代制药工业的重要原料,其提取物目前在临床上有效地用于消化系统、呼吸系统、皮肤病、肝脏疾病等,在食品加工中作为调味品和甜味剂而广泛使用。甘草对机体药物代谢酶系统的影响较为复杂。Paolini等^[1]报道甘草水溶性提取物和其天然成分甘草酸诱导肝脏 CYP3A、CYP1A2 和 CYP2B1 活性,而对 CYP1A1 和 CYP2E1 活性有抑制作用,另有报道^[2]甘草水溶性提取物显著诱导大鼠肝细胞色素 P450,包括 CYP3A 和 CYP2C 酶。然而, Kent 等^[3]体外研究表明甘草醇提取物和其天然成分光果甘草定(光果甘草中的黄酮类成分)以时间和浓度依赖方式使 CYP3A4 失活, Tsukamoto 等^[4]同样发现甘草醇提取物对 CYP3A4 具有抑制作用,其中的黄酮苷类成分起关键作用。

唑吡坦为咪唑吡啶类镇静催眠药,能选择性地与中枢神经系统 γ -氨基丁酸-A(GABA_A)受体 ω_1 亚型结合,具有较强的镇静、催眠作用,但抗惊厥、抗焦虑和肌肉松弛作用较弱,相较于非选择性的苯二氮卓类药物安全性更好。唑吡坦具有起效快、半衰期短的特点,不良反应轻微,临床主要用于治疗短暂性、偶发性失眠症或慢性失眠的短期治疗。唑吡坦口服生物利用度约 70%,消除半衰期仅为 2~2.2 h,在体内经肝 CYP3A4、CYP2C9、CYP1A2 酶广泛代谢^[5],其中以 CYP3A4

为主。唑吡坦在体内经广泛的 CYP 酶介导代谢,肝药酶抑制剂酮康唑、伊曲康唑、伏立康唑使它的平均 AUC 分别增加 1.7, 1.3 和 1.5 倍^[6-7],而贯叶连翘经多次给药后通过诱导 CYP3A4 酶使它的血药浓度降低^[8],表明唑吡坦易产生代谢性的药物相互作用。

鉴于甘草对代谢酶影响的复杂性,可能会影响唑吡坦在体内的代谢,进而改变后者的药动学过程。本研究探讨了两者可能发生的药动学相互作用及其机制,为临床用药安全提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

HP-1100 高效液相色谱仪系列(美国 Agilent 公司),包括 G1322A 脱气装置、G1311A 四元泵、G1313A 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1321A 荧光检测器、HP 化学工作站;FA2004 电子天平(上海光正医疗仪器有限公司);TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

酒石酸唑吡坦片[赛诺菲(杭州)制药有限公司,批号:2T066,规格:每片 10 mg];酒石酸唑吡坦对照品(江苏豪森药业股份有限公司,批号:40246RS111019,纯度:99.5%);甘草配方颗粒(江阴天江药业有限公司,批号:1408164,规格:每包 0.5 g,相当于饮片 3 g,甘草酸含量 6.67%);甲醇为色谱纯;磷酸二氢钾、三乙胺为分析纯;水

为灭菌注射用水。

1.3 动物

Sprague-Dawley(SD)大鼠, ♂, 体质量(259±14)g, 由浙江省实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(浙)2014-0001。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent HC-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.03 mol·L⁻¹磷酸二氢钾溶液(含0.2%三乙胺)-甲醇(33:67); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 激发波长: 254 nm, 发射波长: 390 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL。在此色谱条件下, 唑名坦色谱峰分离良好, 保留时间约 7.17 min, 血浆内源性杂质对样品测定无干扰, 见图 1。

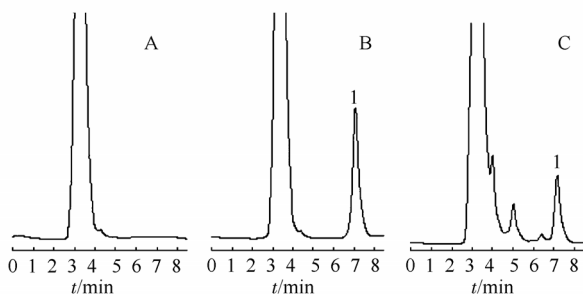


图 1 高效液相色谱图

A-空白血浆; B-对照血浆; C-血浆样品; 1-唑名坦

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-blank plasma; B-plasma spiked with zolpidem; C-zolpidem in rat plasma after administration; 1-zolpidem

2.2 标准贮备液的配制

精密称取酒石酸唑名坦 50 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解至刻度, 混匀, 得 1.00 mg·mL⁻¹ 的标准贮备液, 再以甲醇为溶剂配制成 1, 10, 100, 1 000 μg·mL⁻¹ 的系列对照品溶液, 4℃冰箱保存备用。

2.3 样品处理

取待测大鼠血浆 50 μL, 置塑料离心管(1.5 mL)中, 加入甲醇 0.3 mL, 漩涡混合 30 s, 经 13 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。精密移取上清液 0.3 mL, 50℃水浴下氮气吹干, 残渣用 50 μL 甲醇复溶, 进样测定。

2.4 标准曲线的制备

在塑料离心管(1.5 mL)中分别精密加入酒石酸唑名坦标准液适量, 加入空白血浆 50 μL, 涡旋混匀, 配制成 2, 10, 50, 100, 200 μg·L⁻¹ 的系列标准血浆样品, 按“2.3”项下方法处理样品后进

样测定。测定结果以血浆中酒石酸唑名坦的质量浓度(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $Y=1.8648 X+2.380 8(r=0.999 7)$, 线性范围 2~200 μg·L⁻¹, 最低检测限为 1 μg·L⁻¹, 定量限为 2 μg·L⁻¹。

2.5 回收率与精密度

取空白血浆, 按“2.4”项下方法配制酒石酸浓度为 2, 50, 100 μg·L⁻¹ 的血浆样品各 5 份, 按“2.3”项下方法处理, 另取用甲醇配制成相应浓度的酒石酸唑名坦标准溶液, 直接进样, 将 2 组峰面积进行比较, 计算得到提取回收率分别为 79.72%, 80.60%, 80.77%(n=5)。实验还测定了酒石酸唑名坦浓度分别为 2, 50, 100 μg·L⁻¹ 的血浆样品的日内精密度和日间精密度, 日内精密度 RSD 分别为 5.10%, 2.86% 和 1.40%(n=5), 日间(5 d)精密度 RSD 分别为 9.25%, 5.52% 和 3.22%(n=5)。回收率与精密度均符合生物样品测定方法的要求。

2.6 药动学研究

12 只 SD 大鼠, ♂, 随机分为 2 组, 甘草组每日予甘草提取物(0.5 g·kg⁻¹, ig, qd), 对照组则予相应体积的生理盐水, 共 7 d。禁食 12 h, 于第 7 天分别予甘草提取物和生理盐水 30 min 后, 灌胃给予唑名坦 3 mg·kg⁻¹(酒石酸唑名坦片用生理盐水溶液), 并于给药前和给药后 5, 15, 30 min、1, 2, 3, 4, 6 和 8 h 断尾取血约 0.2 mL, 置于肝素化离心管(1.5 mL)中, 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取血浆。按“2.3”项下方法处理后进样测定, 根据药物峰面积代入标准曲线计算血药浓度, 平均血药浓度-时间曲线见图 2。

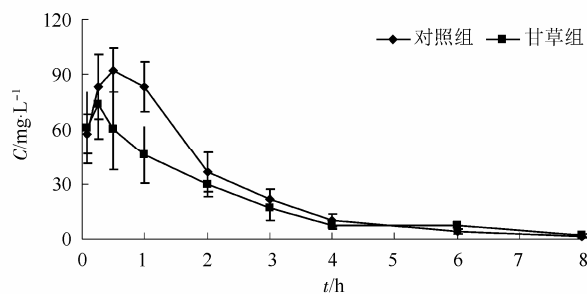


图 2 甘草组和对照组大鼠体内唑名坦(3 mg·kg⁻¹, ig)的血药浓度-时间曲线(n=6)

Fig. 2 Concentration-time curve of zolpidem after intragastric administration (3 mg·kg⁻¹, ig) with or without coadministration of extract of licorice in rats(n=6)

2.7 药动学参数

根据 2 组大鼠各时间点绘制的血药浓度-时间

曲线, 采用 DAS 2.0 软件通过非房室模型分析方法计算药动学参数。经 SPSS 17.0 统计学软件对其进行处理, 2 组药动学参数经独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 结果见表 1。

表 1 大鼠中甘草组和对照组的唑吡坦($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig)药动学参数($n=6$)

Tab. 1 Pharmacokinetic parameters of zolpidem after intragastric administration ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig) with or without coadministration of extract of licorice in rats($n=6$)

药动学参数	对照组	甘草组
t_{\max}/h	0.46 ± 0.10	$0.24 \pm 0.15^{1)}$
$C_{\max}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	96.93 ± 15.32	80.72 ± 16.81
$t_{1/2}/\text{h}$	1.47 ± 0.50	1.82 ± 0.37
$\text{AUC}_{0 \rightarrow 8\text{h}}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	205.07 ± 27.29	$155.00 \pm 27.73^{1)}$
$\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	208.88 ± 26.72	$161.65 \pm 28.41^{1)}$
$\text{CL}/\text{F}/\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	14.56 ± 1.88	$19.23 \pm 4.60^{1)}$

注: 与对照组比较, $^{1)}P < 0.05$ 。

Note: Compared with the saline group, $^{1)}P < 0.05$.

3 讨论

甘草含皂苷类、黄酮类、香豆素类等众多化学成分, 不同提取物或成分对代谢酶的影响各异甚至完全相反, Tsukamoto 等^[4]发现甘草醇提取物中多种黄酮类成分具有抑制 CYP3A4 作用, 而甘草中的主要成分甘草酸予小鼠多次给药后诱导 CYP3A^[1], 王宇光等^[9]报道甘草中 18 位构型不同的两差向异构体 18 β -甘草酸、18 α -甘草酸在转录水平上分别上调和下调大鼠肝细胞 CYP3A 的表达, 这看似矛盾的研究结果显示了中药的复杂性。因此, 甘草对代谢酶的影响是不同活性成分综合作用的结果, 仅仅根据体外研究无法预测是否在体内产生影响, 因此需要更多的体内研究以便更充分地了解甘草可能潜在的药物相互作用, 目前已有较多关于它的药物相互作用研究报道^[10]。

本研究显示, 甘草提取物改变了唑吡坦在大鼠体内的药动学过程, 甘草组的 $\text{AUC}_{0 \rightarrow 8\text{h}}$ 、 $\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$ 明显低于对照组($P < 0.05$), 而 CL/F 显著增高($P < 0.05$), 但 C_{\max} 和 $t_{1/2}$ 两组间比较无统计学差异($P > 0.05$)。研究结果表明, 甘草提取物具有肝药酶诱导作用, 联合用药后唑吡坦的代谢明显加快, 导致唑吡坦的机体暴露量降低, 清除加快。由于唑吡坦在体内经广泛的 CYP 酶介导代谢, 包括

CYP3A4、CYP2C9、CYP1A2 参与, 其中以 CYP3A4 为主, 因此本研究尚不足以明确甘草提取物究竟诱导了哪种代谢酶而产生的影响, 而根据已有的报道资料^[1-2], 主要还是通过诱导 CYP3A4 酶所致, 但有待于进一步的体外研究证实。

总之, 甘草提取物按 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (相当于饮片 $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 剂量连续给药 7 d, 加快了唑吡坦在大鼠体内的代谢, 导致药动学过程的改变, 在一定程度上提示临床上两者合用有潜在的药物相互作用风险。由于存在种属差异, 尚需在人体内做两者的药物相互作用研究进一步确证。

REFERENCES

- PAOLINI M, POZZETTI L, SAPONE A, et al. Effect of licorice and glycyrrhizin on murine liver CYP-dependent monooxygenases [J]. *Life Sci*, 1998, 62(6): 571-582.
- MU Y, ZHANG J N, ZHANG S M, et al. Traditional Chinese medicines Wu Wei Zi (*Schisandra chinensis* Bail) 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.
- KENT U M, AVIRAM M, ROSENBLAT M, et al. The licorice root derived isoflavan glabridin inhibits the activities of human cytochrome P450 3A4, 2B6, and 2C9 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30(6): 709-715.
- TSUKAMOTO S, ABURATANI M, YOSHIDA T, et al. CYP3A4 inhibitors isolated from licorice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(10): 2000-2002.
- VON MOLTKE L L, GREENBLATT D J, GRANDA B W, et al. Zolpidem metabolism *in vitro*: responsible cytochromes, chemical inhibitors, and *in vivo* correlations [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1999, 48(1): 89-97.
- GREENBLATT D J, VON MOLTKE L L, HARMATZ J S, et al. Kinetic and dynamic interaction study of zolpidem with ketoconazole, itraconazole, fluconazole [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1998, 64(6): 661-671.
- SAARI T I, LAINE K, LEINO K, et al. Effect of voriconazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of zolpidem in healthy subjects [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2007, 63(1): 116-120.
- HOJO Y, ECHIZENYA M, OHKUBO T, et al. Drug interaction between St John's wort and zolpidem in healthy subjects [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2011, 36(6): 711-715.
- WANG Y G, YANG M H, MA Z C, et al. Effects of 18 β -glycyrrhizic acid and 18 α -glycyrrhizic acid on mRNA and protein expression of cytochrome P450 3A in cultured rat primary hepatocyte [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2009, 34(3): 307-311.
- CHEN J F, XU P, ZHU S Y, et al. Advance in research for pharmacokinetics and drug interactions of licorice [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2010, 15(10): 1174-1182.

收稿日期: 2015-02-09