

# HPLC-MS-MS法测定大鼠血浆中6种CYP450探针药物 及甘草对CYP450酶活性的影响

武洁, 钟荣玲, 王大为, 黄厚才, 沈红, 李松林\*

(江苏省中医药研究院, 南京 210028)

**[摘要]** 目的:建立高效液相色谱-二级质谱联用(HPLC-MS-MS)法同时测定大鼠血浆中6种细胞色素P450(CYP450)探针药物,即非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、酒石酸美托洛尔、氯唑沙宗和睾酮,并用于体内评价甘草对CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4酶活性的影响。方法:采用汉邦C<sub>18</sub>柱(2.0 mm × 150 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液(70:30),流速为0.2 mL·min<sup>-1</sup>,柱温35℃。电喷雾离子化,检测方式为多反应离子监测。大鼠分为2组,分别ig生理盐水和甘草提取液,连续10 d,于第11天给予大鼠探针药物,用HPLC-MS-MS法测定6种探针药物的血药浓度,并分析比较其药动学参数。结果:HPLC-MS-MS方法的灵敏度、精密性、回收率及稳定性良好。甘草能明显诱导大鼠体内CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1的活性,抑制CYP3A4的活性。结论:本法简便、准确,适用于甘草或其他药物对CYP450同工酶活性的研究。

**[关键词]** 高效液相色谱-二级质谱联用; 细胞色素P450; 探针药物; 甘草

**[中图分类号]** R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0110-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230110

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141027.1529.011.html>

**[网络出版时间]** 2014-10-27 15:29

**[收稿日期]** 20140121(003)

**[基金项目]** 江苏省中医药局科技项目(LZ11064)

**[第一作者]** 武洁, 硕士, 主管药师, 从事中药质量标准及药代动力学研究, Tel:025-85608675, E-mail:wujie613@hotmail.com

**[通讯作者]** \*李松林, 博士, 研究员, 从事中药分析及代谢组学研究, Tel:025-85639640, E-mail:songlinli64@126.com

- [4] Wu C H, Ho Y S, Tsai C Y, et al. *In vitro* and *in vivo* study of phloretin induced apoptosis in human liver cancer cells involving inhibition of type II glucose transporter[J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(9):2210.
- [5] Lu C C, Chen J K. Resveratrol enhances perforin expression and NK cell cytotoxicity through NKG2D-dependent pathways [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 223(2):343.
- [6] Siveen K S, Kuttan G. Augmentation of humoral and cell mediated immune responses by thujone [J]. *Immunopharm*, 2011, 11(12):1967.
- [7] Biswas R, Mandal S K, Dutta S, et al. Thujone-rich fraction of *Thuja occidentalis* demonstrates major anti-cancer potentials: evidences from *in vitro* studies on A375 cells[J]. *Evid-Bas Complem Altern Med*, 2011, 10(3):42.
- [8] Pelkonen O, Abass K, Wiesner I. Thujone and thujone-containing herbal medicinal and botanical products: toxicological assessment[J]. *Regul Tox Pharm*, 2013, 65(1):100.
- [9] Lopes-Lutz D, Alviano D S, Alviano C S, et al. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia essential* oils[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(8):1732.
- [10] National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of alpha, beta-thujone (CAS No. 76231-76-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies)[J]. *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*, 2011, (570):1.
- [11] Bi E, Huang C, Hu Y, et al. Functional assessment of perforin C2 domain mutations illustrates the critical role for calcium-dependent lipid binding in perforin cytotoxic function[J]. *Blood*, 2009, 113(2):338.

[责任编辑 邹晓翠]

## Simultaneous Determination and Evaluation of Glycyrrhizae Radix on Activity of Six Cytochrome P450 Enzymes *in Vivo* Using HPLC-MS-MS

WU Jie, ZHONG Rong-ling, WANG Da-wei, HUANG Hou-cai, SHEN Hong, LI Song-lin\*  
(Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

**[ Abstract ]** **Objective:** An HPLC-MS-MS assay for simultaneous determination of phenacetin, tolbutamide, omeprazole, metoprolol tartaric acid, chlorzoxazone and testosterone simultaneously in rat plasma was established to evaluate Glycyrrhizae Radix on the activity of cytochrome P450 enzymes (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 and CYP3A4). **Method:** The separation was carried out on a Hanbon C<sub>18</sub> column (2.0 mm × 150 mm, 5 μm) at 35 °C. The mobile phase was methanol-0.1% formic acid (70:30), running at a flow rate of 0.2 mL · min<sup>-1</sup>. Mass spectrometry was performed in the multiple reaction monitoring (MRM) mode with an ESI source. Two groups of rats were orally administered with saline solution and decoction of Glycyrrhizae Radix, respectively, for consecutive 10 days. On the 11 th day of administration, a single oral dose of the mixture of 6 probe drugs was given to all rats. The pharmacokinetics of probe drugs in rats was investigated, and the related pharmacokinetic parameters were statistically analyzed. **Result:** The HPLC-MS-MS method was validated with good sensitivity, precision, recovery and stability. It was found that Glycyrrhizae Radix could remarkably induce the enzyme activity of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP2E1, whereas inhibit the enzyme activity of CYP3A4. **Conclusion:** The established method is proved to be sensitive, reliable and simple, which is suitable for the study of Glycyrrhizae Radix or other drugs on the activity of CYP450 enzymes.

**[ Key words ]** HPLC-MS-MS; CYP450; probe drugs; Glycyrrhizae Radix

细胞色素 P450(CYP450)是人体内最重要的药物代谢酶,在许多内、外源性化合物的生物转化中发挥着重要作用,其中 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP 2D6, CYP2E1, CYP3A4 参与了 90% 以上药物的代谢<sup>[1-2]</sup>。目前欧美各国已将 CYP450 酶活性测定用于新药筛选及代谢研究,并把它列为新药申报必须进行的一项实验。“Cocktail”探针药物法是评价药物对 CYP450 酶活性影响及药物相互作用的有效手段。甘草应用广泛,被尊称为“国老”,有调和诸药之功,“十方九草”是中医方剂配伍解毒、调和药性之经典认识。研究甘草与 CYP450 的关系,可以揭示甘草的体内代谢过程,预测甘草与其他药物间的相互作用,为方剂配伍理论研究和临床联合用药提供指导。有文献报道甘草能使 CYP 酶含量增加<sup>[3]</sup>,推测甘草通过诱导 CYP 酶活性加速方剂中其他中药成分的代谢而起到调节诸药、甚至解毒的作用。相关研究多集中在甘草或甘草酸对 CYP 酶某一种亚型的影响,而在整体动物上一次性获得其对 6 种 CYP 酶亚型的影响未有文献报道。本研究建立了高效液相色谱-二级质谱联用(HPLC-MS-MS)法同时

测定大鼠血浆中的 6 种探针药物,其中非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、酒石酸美托洛尔、氯唑沙宗和睾酮分别表征 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 的酶活性,并用于体内评价甘草对 CYP450 酶活性的影响。

### 1 材料

2695-Micromass Quattro micro 液相色谱-质谱联用仪(Waters), Masslynx 4.1 数据处理系统, Mettler 1/100 万电子天平, Micromax 高速离心机(Thermo), 涡旋混合器(美国 SI, Vortex Genie-2), Milli-Q 纯水器(美国), SPD2010 真空离心浓缩仪(Thermo), 旋转蒸发仪(BuchI, R-200)。

甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的根及根茎,产自宁夏,经本院钱士辉研究员鉴定,符合 2010 年版《中国药典》相关项下要求。

非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、酒石酸美托洛尔、氯唑沙宗和睾酮由大连美仑生物技术有限公司提供;内标格列齐特(批号 100269-201004)购自中国食品药品检定研究院。

甲醇为色谱纯(美国 Tedia),甲酸、乙酸乙酯均

为分析纯(南京化学试剂一厂),水经 Milli-Q 纯水器净化。SD 大鼠 12 只,雄性,体重(250 ± 20) g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2012-0001。

## 2 方法

**2.1 溶液配制** 精密称取对照品适量,甲醇溶解,制成含非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、酒石酸美托洛尔、氯唑沙宗、睾酮质量浓度分别为 10, 100, 1, 1, 100, 1 g·L<sup>-1</sup> 的储备液,并用甲醇稀释成系列对照品溶液供分析用,于 4 °C 冰箱中保存。

精密称取格列齐特对照品适量,甲醇溶解,制成质量浓度为 1 g·L<sup>-1</sup> 的内标储备液,并用甲醇稀释至 10 mg·L<sup>-1</sup> 的内标溶液,于 4 °C 冰箱中保存。

**2.2 甘草提取液的制备** 甘草称重,加入 10 倍量去离子水,浸泡 1 h,加热回流 2 次,每次 1 h,合并提取液,滤纸过滤去除杂质,旋转蒸发浓缩至药液质量浓度为 0.16 g·mL<sup>-1</sup>。

**2.3 探针药物的制备** 称取非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、酒石酸美托洛尔、氯唑沙宗、睾酮溶于 0.5% CMC-Na 溶液中,使其质量浓度分别为 1, 1, 1, 2.5, 41, 2 g·L<sup>-1</sup>。

**2.4 分析条件** 色谱柱为汉邦 C<sub>18</sub> 柱(2.0 mm × 150 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.1% 甲酸水溶液(70:30),流速为 0.2 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 35 °C。

电喷雾离子化,毛细管电压 3 kV,离子源温度 110 °C,干燥气温度 400 °C,干燥气流速 400 L·h<sup>-1</sup>。检测方式为多反应离子监测(MRM),用于定量分析监测的离子反应以及相对应的锥孔电压和碰撞能量见表 1。碰撞室压力(氩气)4.0 × 10<sup>-4</sup> kPa。

表 1 探针药物和内标的离子反应及对应的锥孔电压和碰撞能量

分析物	离子极性 (ESI)	离子反应 (m/z → m/z)	锥孔电压 /V	碰撞能量 /eV
非那西丁	+	180.6 → 110.3	35	20
甲苯磺丁脲	+	271.5 → 74.3	25	15
奥美拉唑	+	346.4 → 198.4	20	12
酒石酸美托洛尔	+	268.6 → 116.4	35	20
氯唑沙宗	-	168.6 → 132.3	40	20
睾酮	+	289.5 → 97.3	35	25
格列齐特(内标)	+	324.4 → 127.4	30	20
	-	322.5 → 170.3	35	25

**2.5 血浆样品的处理** 取待测血浆 100 μL 于 1.5 mL eppendorf 管中,加入内标溶液(10 mg·L<sup>-1</sup>) 10 μL 振荡 10 s,加乙酸乙酯 0.5 mL,振荡 2 min,

15 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,取上清液 450 μL 于 45 °C 真空浓缩至干,残渣加 100 μL 流动相溶解,振荡 2 min,15 000 r·min<sup>-1</sup> 高速离心 5 min,上清液 5 μL 进入 HPLC-MS-MS 仪分析。

**2.6 受试大鼠给药方案** 大鼠 12 只,随机分为 2 组,每组 6 只,Ⅰ组 ig 生理盐水,Ⅱ组 ig 甘草提取液(0.8 g·kg<sup>-1</sup>),每天上午 8:30 给药,连续 10 d,于第 11 天给大鼠 ig 探针药物混合溶液(10 mL·kg<sup>-1</sup>),并于给药前及给药后 0.083 3, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5, 8, 12, 24 h 眼底静脉丛取血 300 μL,置于肝素化试管中,4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,分离出血浆冷冻至分析。取血期间给予大鼠适量生理盐水以补充体液。

## 3 结果

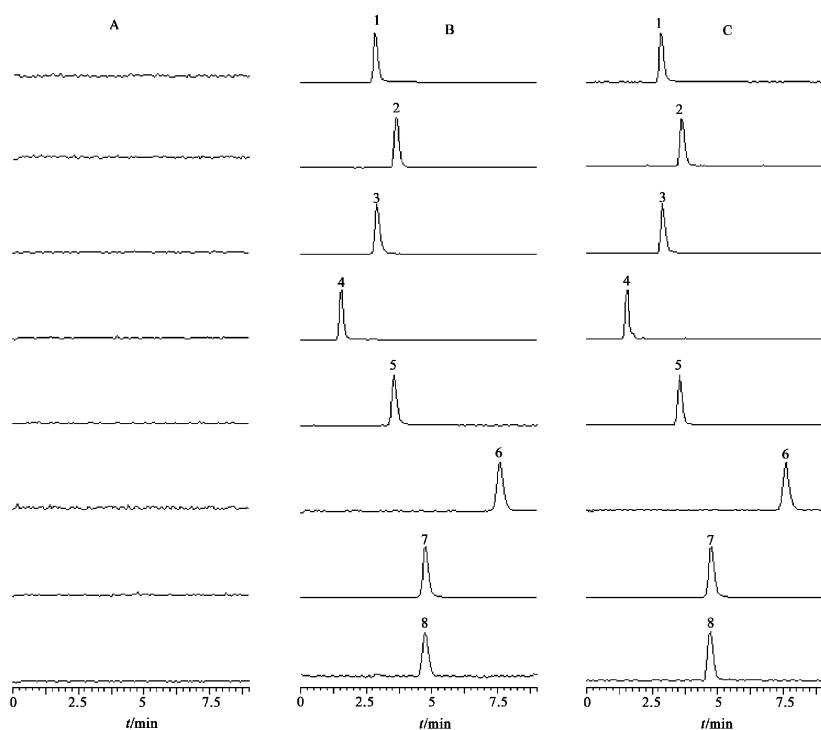
**3.1 方法的专属性** 在上述色谱条件下,非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、酒石酸美托洛尔、氯唑沙宗、睾酮及内标格列齐特峰形良好,保留时间分别为 2.8, 3.6, 2.9, 1.6, 3.6, 7.6, 4.8 min(图 1),血浆中的杂质不干扰样品测定。

**3.2 线性关系及定量限** 分别精密吸取系列浓度的对照品溶液 10 μL,加入至 100 μL 大鼠空白血浆中,按“血浆样品的处理”项下操作,记录峰面积。以探针药物峰面积与内标峰面积的比值(f)对浓度(C)作直线回归。标准曲线及定量限(S/N > 10),见表 2。

**3.3 回收率试验** 配制含探针药物低、中、高浓度的血浆样品,先不加内标,按“血浆样品的处理”项下操作,离心后上清液中加入内标溶液 10 μL,真空浓缩至干。另外,取空白血浆 100 μL,按“血浆样品的处理”项下操作,离心后上清液中加入相应浓度的探针药物对照品溶液和内标溶液,真空浓缩至干。残渣用 100 μL 流动相溶解,进样分析,得到探针药物和内标的峰面积比值。将两种处理方法得到的峰面积比值进行比较,得到探针药物的提取回收率,见表 3。

另外配制含探针药物低、中、高浓度的血浆样品,按“血浆样品的处理”项下操作,记录峰面积。以探针药物与内标的峰面积比值带入当日随行标准曲线,计算所得浓度除以添加浓度,即得相对回收率,见表 3。

**3.4 基质效应** 取空白血浆 100 μL,按“血浆样品的处理”项下操作,离心后上清液中加入相应浓度的探针药物对照品溶液和内标溶液,真空浓缩至干。另取空白甲醇 100 μL,加入相应浓度的探针药物对



A. 空白血浆;B. 空白血浆中加入6种探针药物及内标对照品溶液;C. 大鼠给药后1h的血浆;

1. 非那西丁;2. 甲苯磺丁脲;3. 奥美拉唑;4. 酒石酸美托洛尔;5. 氯唑沙宗;6. 睾酮;7. 格列齐特( $ESI^+$ );8. 格列齐特( $ESI^-$ )

图1 甘草提取液给药大鼠血浆色谱

表2 6种探针药物的标准曲线及定量限

药物	标准曲线	$r$	线性范围/ $mg \cdot L^{-1}$	LOQ/ $\mu g \cdot L^{-1}$
非那西丁	$f_1 = 0.0003C_1 + 0.0086$	0.9997	0.01 ~ 25	1
甲苯磺丁脲	$f_2 = 0.0388C_2 + 0.0063$	0.9996	0.1 ~ 250	10
奥美拉唑	$f_3 = 0.00013C_3 + 0.0007$	0.9998	0.01 ~ 2.5	0.5
酒石酸美托洛尔	$f_4 = 0.0002C_4 + 0.0003$	0.9996	0.01 ~ 2.5	0.5
氯唑沙宗	$f_5 = 1.8299C_5 + 0.23$	0.9995	0.1 ~ 250	10
睾酮	$f_6 = 0.00012C_6 + 0.0011$	0.9996	10.01 ~ 1	0.5

表3 6种探针药物在血浆中的回收率和基质效应( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

药物	加入量/ $mg \cdot L^{-1}$	提取回收率/%	RSD/%	相对回收率/%	RSD/%	基质效应/%	RSD/%
非那西丁	0.025	88.24 ± 1.67	1.9	109.47 ± 3.78	3.5	84.16 ± 9.32	11.1
	0.5	89.60 ± 7.38	8.2	101.08 ± 4.09	4.1	94.19 ± 5.47	5.8
	20	92.74 ± 6.40	6.9	97.96 ± 7.44	7.6	89.61 ± 7.73	8.6
甲苯磺丁脲	0.25	72.32 ± 3.80	5.3	97.71 ± 12.55	12.9	100.02 ± 1.52	1.5
	5	73.32 ± 3.19	4.4	106.09 ± 5.69	5.4	96.66 ± 6.17	6.4
	200	71.09 ± 4.91	6.9	107.92 ± 5.24	4.9	92.42 ± 6.49	7.0
奥美拉唑	0.0025	95.34 ± 3.34	3.5	93.59 ± 5.71	6.1	80.82 ± 5.97	7.4
	0.05	89.42 ± 9.06	10.1	104.38 ± 6.36	6.1	80.15 ± 2.52	3.1
	2	98.57 ± 2.69	2.7	89.80 ± 2.87	3.2	88.94 ± 6.04	6.8
酒石酸美托洛尔	0.0025	82.83 ± 5.18	6.3	107.49 ± 5.89	5.5	80.75 ± 4.69	5.8
	0.05	82.36 ± 7.53	9.1	96.81 ± 6.22	6.4	82.35 ± 8.01	9.7
	2	76.04 ± 1.25	1.6	99.01 ± 3.96	4.0	86.01 ± 7.27	8.5

续表 3

药物	加入量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	提取回收率/%	RSD/%	相对回收率/%	RSD/%	基质效应/%	RSD/%
氯唑沙宗	0.25	$88.64 \pm 5.04$	5.7	$101.80 \pm 12.76$	12.5	$85.86 \pm 4.63$	5.5
	5	$87.93 \pm 7.45$	8.7	$106.98 \pm 3.65$	3.4	$95.00 \pm 6.74$	7.1
	200	$96.27 \pm 3.31$	3.4	$99.54 \pm 6.23$	6.3	$95.29 \pm 2.05$	2.2
睾酮	0.002 5	$98.00 \pm 5.23$	5.3	$106.50 \pm 7.12$	6.7	$91.80 \pm 5.69$	6.2
	0.05	$93.72 \pm 5.21$	5.6	$104.30 \pm 8.40$	8.1	$94.42 \pm 5.96$	6.3
	1	$89.45 \pm 1.60$	1.8	$101.75 \pm 5.59$	5.5	$103.39 \pm 3.43$	3.3
格列齐特	1	-	-	-	-	$96.24 \pm 6.30$	6.6

照品溶液和内标溶液,真空浓缩至干。残渣用 100  $\mu\text{L}$  流动相溶解,进样分析,得到探针药物和内标的峰面积比值。将两种处理方法得到的峰面积比值进行比较,得到探针药物及内标的基质效应,见表 3。

### 3.5 精密度试验 配制含探针药物浓度低、中、高

的血浆样品,按“血浆样品的处理”项下操作,每种浓度各做 15 份样品,每一浓度在 1 天内测定 5 次考察批内精密度,连续 3 d 测定考察批间精密度。将峰面积比值代入当天标准曲线计算浓度,并求得批内和批间精密度,见表 4。

表 4 6 种探针药物分析方法的精密度 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

药物	加入量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	批内精密度		批间精密度	
		测得量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%	测得量/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%
非那西丁	0.025	$0.027 4 \pm 0.000 9$	3.5	$0.027 4 \pm 0.001 1$	3.9
	0.5	$0.505 4 \pm 0.020 5$	4.1	$0.501 9 \pm 0.020 7$	4.1
	20	$19.592 4 \pm 1.488 4$	7.6	$19.884 2 \pm 1.459 6$	7.3
甲苯磺丁脲	0.25	$0.244 3 \pm 0.031 4$	13.0	$0.251 3 \pm 0.029 4$	12.0
	5	$5.304 3 \pm 0.284 7$	5.4	$5.250 4 \pm 0.282 0$	5.4
	200	$215.830 7 \pm 10.489 5$	4.9	$217.896 1 \pm 10.273 4$	4.7
奥美拉唑	0.002 5	$0.002 3 \pm 0.000 1$	6.1	$0.002 3 \pm 0.000 2$	6.7
	0.05	$0.052 2 \pm 0.003 2$	6.1	$0.051 8 \pm 0.003 4$	6.6
	2	$1.850 7 \pm 0.057 4$	3.1	$1.840 0 \pm 0.062 6$	3.4
酒石酸美托洛尔	0.002 5	$0.002 7 \pm 0.000 1$	5.5	$0.002 7 \pm 0.000 2$	5.8
	0.05	$0.048 4 \pm 0.003 1$	6.4	$0.048 6 \pm 0.003 4$	7.1
	2	$1.980 2 \pm 0.079 1$	4.0	$2.000 0 \pm 0.069 8$	3.5
氯唑沙宗	0.25	$0.254 5 \pm 0.031 9$	13.0	$0.249 3 \pm 0.032 7$	13.0
	5	$5.348 9 \pm 0.182 6$	3.4	$5.361 1 \pm 0.201 3$	3.8
	200	$199.077 3 \pm 12.461 1$	6.3	$196.670 6 \pm 12.274 2$	6.2
睾酮	0.002 5	$0.002 7 \pm 0.000 2$	6.7	$0.002 6 \pm 0.000 2$	7.4
	0.05	$0.052 2 \pm 0.004 2$	8.1	$0.051 3 \pm 0.004 1$	8.1
	1	$1.017 5 \pm 0.059 9$	5.5	$1.037 5 \pm 0.031 4$	3.0

3.6 稳定性试验 配制含探针药物低、中、高浓度的血浆样品,按“血浆样品的处理”项下操作,分别进行血浆室温放置、提取物冰箱中保存、冷冻和冻融稳定性考察,结果 6 种药物在血浆中测定浓度的相对误差  $< 15\%$ ,说明血浆室温放置 12 h 含量没有下降;血浆经过提取、干燥后于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存 48 h

含量未发生变化;血浆在 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中储存 5 d 和在 5 d 内反复冻融 3 次未出现降解。

3.7 药动学研究 采用 DAS2.0 软件以统计矩方法求算各组大鼠单剂量口服探针药物后的药动学参数,并用 SPSS 11.5 进行组间平均值  $t$  检验,见表 5,平均血药浓度-时间曲线(图 2)。

表5 6种探针药物的主要药动学参数( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

药动学参数	组别	非那西丁	甲苯磺丁脲	奥美拉唑	酒石酸美托洛尔	氯唑沙宗	睾酮
$AUC_{0 \rightarrow \infty} / \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	对照	14.65 ± 3.84	1 885.34 ± 214.86	1.12 ± 0.27	2.34 ± 0.44	118.14 ± 20.46	(147.92 ± 37.37) × 10 <sup>-3</sup>
	甘草	5.02 ± 1.47 <sup>1)</sup>	1 384.20 ± 195.10 <sup>1)</sup>	0.26 ± 0.05 <sup>1)</sup>	0.69 ± 0.07 <sup>1)</sup>	83.33 ± 21.70 <sup>1)</sup>	(248.12 ± 82.08) × 10 <sup>-3</sup> <sup>1)</sup>
$t_{1/2} / \text{h}$	对照	9.92 ± 1.46	4.95 ± 0.49	1.59 ± 0.69	6.73 ± 2.92	0.97 ± 0.42	3.27 ± 0.64
	甘草	6.99 ± 2.34	6.09 ± 0.91 <sup>1)</sup>	1.04 ± 0.37	7.00 ± 3.36	0.91 ± 0.30	2.84 ± 1.09
$T_{\text{max}} / \text{h}$	对照	0.30 ± 0.11	1.40 ± 0.55	0.25 ± 0.00	0.31 ± 0.13	0.30 ± 0.11	0.85 ± 0.49
	甘草	0.40 ± 0.14	1.90 ± 0.74	0.35 ± 0.14	0.45 ± 0.11	0.50 ± 0.31	1.05 ± 0.51
$CL / \text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	对照	1.28 ± 0.36	(5.20 ± 0.80) × 10 <sup>-3</sup>	9.40 ± 2.51	10.95 ± 2011	0.35 ± 0.06	266.43 ± 60.34
	甘草	4.34 ± 1.29 <sup>1)</sup>	(6.80 ± 1.30) × 10 <sup>-3</sup> <sup>1)</sup>	35.24 ± 2.57 <sup>1)</sup>	35.46 ± 3.79 <sup>1)</sup>	0.51 ± 0.16	173.27 ± 74.48 <sup>1)</sup>
$C_{\text{max}} / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	对照	19.79 ± 3.16	243.20 ± 28.02	2.00 ± 0.45	2.09 ± 0.41	102.35 ± 39.65	(54.47 ± 6.12) × 10 <sup>-3</sup>
	甘草	4.42 ± 1.13 <sup>1)</sup>	138.98 ± 8.37 <sup>1)</sup>	0.32 ± 0.05 <sup>1)</sup>	0.45 ± 0.12 <sup>1)</sup>	55.65 ± 15.52 <sup>1)</sup>	(73.92 ± 13.67) × 10 <sup>-3</sup> <sup>1)</sup>

注:与对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ 。

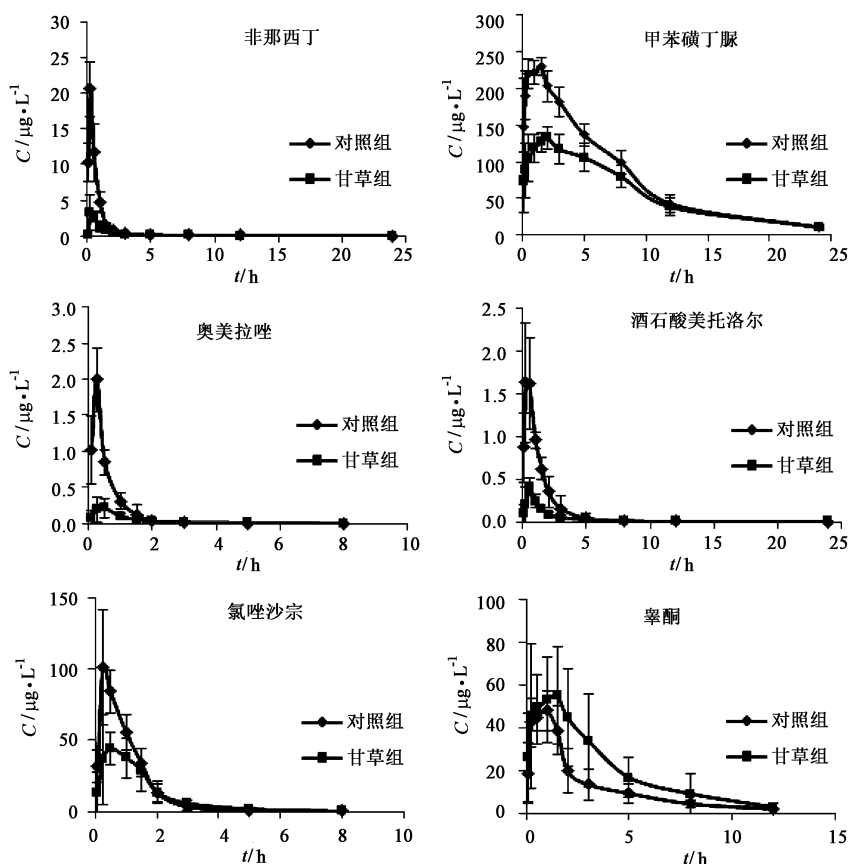


图2 大鼠口服探针药物后的平均血药浓度-时间曲线( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

由表5可知,和对照组相比,甘草能使非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、酒石酸美托洛尔和氯唑沙宗的代谢加快,AUC和 $C_{\text{max}}$ 均显著性降低,非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑和酒石酸美托洛尔清除率显著性增加,表现出对CYP1A2,CYP2C9,CYP2C19,CYP2D6,CYP2E1酶的诱导作用;而甘草组大鼠体内代谢睾酮的速度明显减慢,具体表现在AUC, $C_{\text{max}}$ 的显著性增加和清除率的显著减慢,说明

甘草对CYP3A4酶有抑制作用。

#### 4 讨论

由于非那西丁、酒石酸美托洛尔和睾酮在正离子模式下响应较强,而氯唑沙宗仅在负离子模式下有较强响应,因此本实验采用正、负离子同时扫描的方式。为了同时消除正、负离子状态下的仪器测定误差,需要选择正、负离子状态下均有较好响应的内标,格列齐特结构中含有叔胺基和磺酰胺基,既可产

生  $[M + H]^+$  峰,也可产生  $[M - H]^-$  峰,同时格列齐特在现有色谱条件下分离良好,稳定可靠,最终被选择作为内标。

选择适当的探针药物来评价 CYP450 酶活性是广为接受的方法。通过建立恰当的药动学指标反映 CYP 表型,进而评价肝脏的药物代谢能力可望成为监测肝脏代谢功能及制定临床给药方案的重要手段<sup>[4]</sup>。根据 FDA 指导原则以及国内外相关文献推荐的用于研究 CYP450 同工酶的最优探针药物,本实验选择了非那西丁<sup>[5-6]</sup>、甲苯磺丁脲<sup>[5,7]</sup>、奥美拉唑<sup>[7-8]</sup>、酒石酸美托洛尔<sup>[7-8]</sup>、氯唑沙宗<sup>[5,9]</sup> 和 睾酮<sup>[5,10]</sup> 作为探针药物。通过对 6 种探针药物在大鼠体内药动学参数的统计学分析,发现甘草对 CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 有诱导作用,而对 CYP3A4 有抑制作用。有研究发现甘草能诱导 CYP1A2<sup>[11]</sup>, CYP2E1<sup>[12]</sup> 的活性,抑制 CYP3A4<sup>[13]</sup> 的活性,这与本实验结果一致。因此甘草在临床上合并使用经 CYP450 代谢的药物时,应充分考虑其对合用药物代谢的影响,必要时调整合用药物的给药剂量,避免不良反应的发生。

本实验建立了简便、准确的 HPLC-MS-MS 法同时测定了大鼠血浆中的 6 种探针药物,可一次性获得 6 种 CYP450 酶活性的信息,适用于研究中药及化学药物对 CYP450 酶的诱导和抑制作用,同时也有助于对因药物代谢性相互作用引起的不良反应进行预测,为中医方剂科学配伍和临床合理用药提供理论依据。

### [参考文献]

[ 1 ] Meyer U A. Overview of enzymes of drug metabolism [J]. J Pharmacokinet Biopharm, 1996, 24(5):449.  
[ 2 ] Wroblewski B, Glenn M B. The cytochrome P450 drug metabolizing enzyme system: an overview of potential clinically important drug interactions [J]. J Head Trauma Rehabil, 2002, 17(6):571.  
[ 3 ] 陈健龙, 张玉玲, 董宇, 等. Cocktail 探针药物法评价小檗碱对肝微粒体 CYP450 酶的抑制作用[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(12):2009.  
[ 4 ] Or P M, Lam F F, Kwan Y W, et al. Effects of Radix Astragali and Radix Rehmanniae, the components of an

anti-diabetic foot ulcer herbal formula, on metabolism of model CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 and CYP3A4 probe substrates in pooled human liver microsomes and specific CYP isoforms [J]. Phytomedicine, 2012, 19(6):535.

[ 5 ] Venkatakrisnan K, Moltke L L, Greenblatt D J. Human cytochromes P450 mediating phenacetin O-deethylation *in vitro*; validation of the high affinity component as an index of CYP1A2 activity [J]. J Pharm Sci, 1998, 87(12):1502.  
[ 6 ] Huang Q, Deshmukh R S, Ericksen S S, et al. Referred binding orientations of phenacetin in CYP1A1 and CYP1A2 are associated with isoform-selective metabolism [J]. Drug Metab Dispos, 2012, 40(12):2324.  
[ 7 ] Wang X, Han A, Wen C, et al. The effects of H2S on the activities of CYP2B6, CYP2D6, CYP3A4, CYP2C19 and CYP2C9 *in vivo* in rat[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(12):24055.  
[ 8 ] Turpault S, Brian W, Van Horn R, et al. Pharmacokinetic assessment of a five-probe cocktail for CYPs 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A [J]. Br J Clin Pharmacol, 2009, 68(6):928.  
[ 9 ] Kwon M H, Lee C J, Cho Y Y, et al. Pharmacokinetics of a cytochrome P450 2E1 probe, chlorzoxazone, and its 6-hydroxy metabolite in poloxamer 407-induced hyperlipidemic rats [J]. J Pharm Pharm Sci, 2013, 16(4):648.  
[ 10 ] Behera D, Pattem R, Kumar M S, et al. Utility of a column-switching LC/MS/MS method in cytochrome P450 inhibition assays using human liver microsomes [J]. Drug Metabol Drug Interact, 2013, 28(3):177.  
[ 11 ] 何益军, 石苏英, 金科涛, 等. 甘草与大戟甘遂芫花配伍对大鼠肝脏细胞色素 P4501A2 酶活性的影响[J]. 中国药物与临床, 2007, 7(4):278.  
[ 12 ] 代方国, 罗仁, 王宇光, 等. 甘遂配伍甘草对大鼠肝脏 CYP2E1 表达及活性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(8):742.  
[ 13 ] 张广平, 朱丽君, 周娟, 等. 附子配伍甘草对 CYP3A4 体内活性的影响研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(15):2206.

[责任编辑 邹晓翠]