

## 4种附子配伍方给药后大鼠血浆中 3个乌头类生物碱的药动学比较

何雷萍<sup>1,2</sup>, 狄斌<sup>1\*</sup>, 杜迎翔<sup>1,2\*\*</sup>, 严方<sup>1</sup>, 刘华清<sup>1</sup>

(中国药科大学<sup>1</sup> 药物质量与安全预警教育部重点实验室;<sup>2</sup> 分析化学教研室, 南京 210009)

**摘要 目的:** 研究大鼠灌胃给予含附子汤剂后乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的药动学。**方法:** 4组大鼠分别灌胃给予四逆汤(药液 a)、附子水煎液(药液 b)、附子加炙甘草水煎液(药液 c)及附子加干姜水煎液(药液 d), 用 LC-MS-MS 方法测定大鼠血浆中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的浓度, 采用 DAS 2.0 计算药动学参数。**结果:** 4种不同配伍方给药后, 乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的药动学参数有差异。与附子水煎液比, 炙甘草与附子配伍, 使乌头碱、新乌头碱和次乌头碱 3 个成分的  $t_{\max}$  延迟,  $MRT_{0-t}$  延长, 且血药浓度-时间曲线出现多峰现象; 由干姜及炙甘草配伍附子的四逆汤给药后  $t_{\max}$  延迟,  $MRT_{0-t}$  缩短。**结论:** 药材配伍对相同成分的药动学行为有影响。

**关键词** 乌头碱; 新乌头碱; 次乌头碱; 药动学

中图分类号 R917; R969.1 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2010)01-0055-05

## Comparative pharmacokinetics of aconitine, mesaconitine and hyaconitine in rats after oral administration of four decoctions composed with Radix Aconiti Lateralis

HE Lei-ping<sup>1,2</sup>, DI Bin<sup>1\*</sup>, DU Ying-xiang<sup>1,2\*\*</sup>, YAN Fang<sup>1</sup>, LIU Hua-qing<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education; <sup>2</sup>Department of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract Aim:** To study pharmacokinetics of aconitine, mesaconitine and hyaconitine in rats after single oral administration of decoctions composed with Radix Aconiti Lateralis. **Methods:** Four groups of rats were orally administered four decoctions including decoction **a** (*Sini* decoction), decoction **b** (decoction composed with Radix Aconiti Lateralis), decoction **c** (decoction composed with Radix Aconiti Lateralis and Radix et Rhizoma Glycyrrhizae Praeparata Cum Melle) and decoction **d** (decoction composed with Radix Aconiti Lateralis and Rhizoma Zingiberis), respectively. Quantitative analysis of aconitine, mesaconitine and hyaconitine in rat plasma was achieved using a liquid chromatography-electrospray ionization/tandem mass spectrometry method. Pharmacokinetic parameters were estimated using DAS 2.0. **Results:** Pharmacokinetic parameters of aconitine, mesaconitine and hyaconitine were different after oral administration of four decoctions according to Radix Aconiti Lateralis combined with different herbal medicines. Multiple peaks were observed in plasma concentration-time curve after oral administration of the decoction of herb couple Radix Aconiti Lateralis and Radix et Rhizoma Glycyrrhizae Praeparata Cum Melle, and the results showed a delay in  $t_{\max}$  and a prolonger in  $MRT_{0-t}$  compared with the decoction of Radix Aconiti Lateralis. When Radix Aconiti Lateralis was combined with Radix et Rhizoma Glycyrrhizae Praeparata Cum Melle and Rhizoma Zingiberis at the same time in *Sini* decoction,  $t_{\max}$  was delayed too but  $MRT_{0-t}$  was shorter than that of the group of Radix Aconiti Lateralis. **Conclusion:** The pharmacokinetic parameters of the three compounds obtained in this work shows that the pharmacokinetics of aconitine, mesaconitine and hyaconitine were influenced diversely when Radix Aconiti Lateralis was combined with different herbal medicines.

\* 收稿日期 2009-09-01 通讯作者 \* Tel: 025-83271269 E-mail: dibin@cpu.edu.cn

\*\* Tel: 13401927478 E-mail: yingxiangdu@163.com

**Key words** aconitine; mesaconitine; hyaconitine; pharmacokinetics

附子为毛茛科植物乌头(*Aconitum carmichaeli* Debx)的子根,味辛、甘,性热,有毒,首载于《神农本草经》,被列为下品,但具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛之功效。中医理论认为,通过科学配伍,可降低附子毒性,发挥其特长。善用附子者,当首推医圣张仲景,《伤寒论》中有相当多的复方应用了附子,其中四逆汤是回阳救逆的经典名方,组方简单,由生附子一枚,配以干姜、炙甘草而成<sup>[1]</sup>。目前已知乌头类生物碱是四逆汤中发挥药效作用的部分,其中包括乌头碱、新乌头碱和次乌头碱等双酯型二萜类生物碱(diester diterpenoid alkaloids, DDAs)。DDAs具有毒性,在较低浓度即可产生毒性反应,治疗窗窄<sup>[2-3]</sup>。

已有文献采用 LD<sub>50</sub> 补量法<sup>[4]</sup>、药物累积法<sup>[5]</sup>等对乌头类生物碱药动学数据进行报道,这些方法可以测得表观动力学参数,但方法间参数有一些差异。李锐等<sup>[6]</sup>用 LC 法测定了犬血清中的乌头碱浓度并计算药动学参数,但血清用量大,且方法灵敏度不高。王朝虹等<sup>[7]</sup>以 LC-MS 为手段测定了大鼠经口给予乌头碱单体(0.5 mg/kg)后的药动学参数。Zhang 等<sup>[8]</sup>也报道了用 LC-MS 同时测定血浆中乌头碱、新乌头碱、次乌头碱浓度的方法,但在所建立方法下,灵敏度不高,并未能获得完整的药动学数据。

目前已有不少文献利用 LC-MS 对生物样品中的乌头碱、新乌头碱和次乌头碱进行检测<sup>[9-10]</sup>,主要涉及法医毒物分析等,但所建立的方法灵敏度不高,文献最低定量限做到 0.1 ng/mL<sup>[8]</sup>。由于乌头碱、新乌头碱、次乌头碱具有毒性,且在汤剂中含量较低,文献报道方法尚不能测得完整的药动学曲线,需要建立更为灵敏的方法进行检测。本文采用简单的液液萃取,利用 LC-MS-MS 的选择反应监测(SRM)模式,把最低定量限浓度降至 0.01 ng/mL,灵敏、专属地进行了 3 个成分的同时测定,并完成了 4 个含附子药材汤剂的药动学研究。

## 1 材料

### 1.1 药材、药品和试剂

生附子、干姜、炙甘草,均购自安徽亳州药材公司,并由中国药科大学中药学院秦民坚教授鉴定。

乌头碱(批号:110720-200410)、新乌头碱(批号:110799-200404)和次乌头碱(批号:110798-200404)均购自中国药品生物制品检定所;西酞普兰(纯度 > 98.5%,海南三叶制药有限公司);甲醇、乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司);其余试剂均为市售分析纯;水为去离子纯化水。

### 1.2 仪器

Finnigan HPLC 系统, Finnigan Surveyor 自动进样器, Finnigan TSQ Quantum Ultra 质谱仪, ESI 离子源(美国 Thermo Electron 公司); BS21S 十万分之一分析天平(德国 Satorius 公司); PL 5242 实验室超纯水系统(美国 Pall 公司)。

### 1.3 动物

清洁级 SD 大鼠, 雄性, 体重 180 ~ 220 g, 南京医科大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK(苏)2008-0004。

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Lichrospher CN (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 江苏汉邦科技有限公司); 流动相: 甲醇-醋酸铵缓冲液(40 mmol/L)-甲酸(95:45:5); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25 °C。

### 2.2 质谱条件

离子化方式: ESI; 扫描方式: SRM; 离子模式: 正离子; 检测离子: 乌头碱 [M + H]<sup>+</sup>, *m/z* 646.1 → 586.1; 新乌头碱 [M + H]<sup>+</sup>, *m/z* 632.1 → 572.1; 次乌头碱 [M + H]<sup>+</sup>, *m/z* 616.1 → 556.1; 内标西酞普兰 [M + H]<sup>+</sup>, *m/z* 325.0 → 262.0; 喷雾电压 5 000 V; 加热毛细管温度 350 °C; 源碰撞诱导解离电压 10 eV; 碰撞能为 35 eV; 鞘气(N<sub>2</sub>)压力 2.07 × 10<sup>5</sup> Pa; 辅助气压力 3.45 × 10<sup>4</sup> Pa; 碰撞气(Ar)压力为 0.20 Pa。

### 2.3 标准溶液的配制及药材水煎剂的制备

精密称取乌头碱、新乌头碱和次乌头碱各 5 mg 置 100 mL 量瓶中, 加入含 0.1% HCl 的乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀即得 50 μg/mL 对照品储备液。取储备液加入含 0.1% HCl 的乙腈依次稀释为 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 8, 16, 40, 200 ng/mL 的对照品标准溶液。精密称取西酞普兰 5 mg, 置 100

mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀即得50  $\mu\text{g/mL}$  西酞普兰储备液。取储备液加入甲醇稀释得200  $\text{ng/mL}$  西酞普兰标准溶液。称取生附子5 g,干姜15 g,炙甘草20 g,加水600 mL,加热至沸腾并保持1 h。药液趁热用纱布过滤至250 mL量瓶,用少量水洗涤药渣,过滤,合并滤液和洗液,用水定容,即得药液a。称取生附子5 g,按相同煎煮条件制备得药液b。称取生附子5 g,炙甘草20 g,按相同煎煮条件制备得药液c。称取生附子5 g,干姜15 g,按相同煎煮条件制备得药液d。以上各溶液均置于4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

### 2.4 血浆样品处理

血浆样品0.1 mL,加入西酞普兰溶液(内标)5  $\mu\text{L}$ ,涡旋30 s,加入10% 氨水碱化,并加乙酸乙酯1 mL,涡旋3 min,12 000 r/min离心3 min,上清于40  $^{\circ}\text{C}$  水浴用 $\text{N}_2$ 吹干,用流动相80  $\mu\text{L}$ 复溶,

12 000 r/min离心3 min,取上清20  $\mu\text{L}$ 进样。

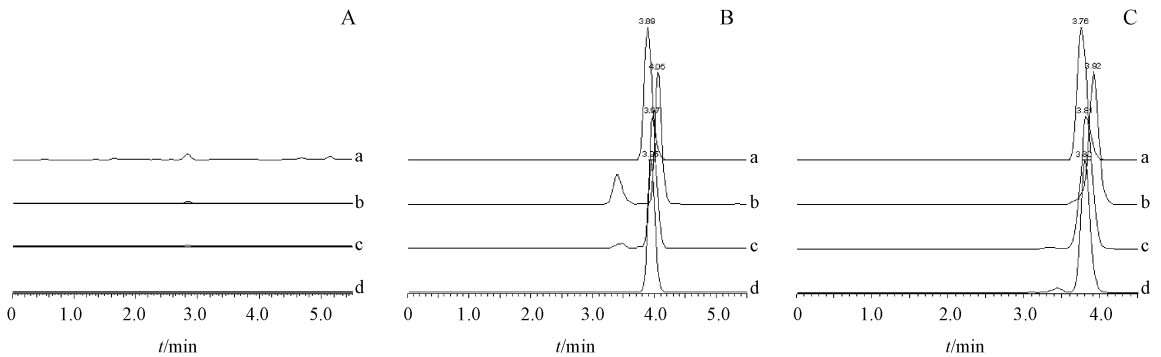
### 2.5 大鼠体内药动学

SD大鼠20只,随机分为4组,实验前禁食12 h,自由饮水。按22.5 mL/kg分别灌胃给予药液a~d。于给药前及给药后0.083,0.25,0.5,0.75,1,1.5,2,3,5,8,12,16,24 h从眼底静脉丛取血0.3 mL置肝素化的Eppendorf管中,4 000 r/min离心10 min,分离血浆,置-20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存待测。

## 3 结果

### 3.1 专属性考察

在本试验条件下,大鼠血浆中杂质不干扰各样品峰及内标峰,乌头碱、新乌头碱、次乌头碱及内标的保留时间分别为3.95,3.97,4.05,3.89 min(见图1)。基质效应考察后发现无明显基质效应。



**Figure 1** Chromatograms of blank plasma(A), blank plasma spiked with standard solution(B) and plasma sample obtained 2 h after oral administration of decoction a(C)

a: citalopram (IS); b: hypoaconitine; c: mesaconitine; d: aconitine

### 3.2 标准曲线的制备

取大鼠空白血浆0.1 mL,加入不同浓度的标准品5  $\mu\text{L}$ ,使其质量浓度分别为0.01,0.02,0.04,0.08,0.4,0.8,2,10  $\text{ng/mL}$ ,按“2.4”项处理,利用标准品峰面积与内标峰面积比( $R$ )对血药浓度( $c$ )作权重回归。回归曲线表明,乌头碱、新乌头碱和次乌头碱均在0.01~10  $\text{ng/mL}$ 浓度范围内具有良好的线性关系,定量下限为0.01  $\text{ng/mL}$ ,回归方程分别为:乌头碱, $c = 374 \times R + 4.68$ ;新乌头碱, $c = 372 \times R + 5.00$ ;次乌头碱, $c = 328 \times R + 6.44$ 。权重系数 $w = 1/c^2$ 。

### 3.3 准确度、精密度和提取回收率

配制各含乌头碱、新乌头碱和次乌头碱0.02,0.4,2  $\text{ng/mL}$ 低、中、高3个浓度的标准含药血浆,按“2.4”项处理,记录图谱,根据标准曲线方程计算浓度,测得浓度和加入浓度的比值即为准确度。

在批内和批间(3 d)对低、中、高3个浓度各做5份样品,测得乌头碱、新乌头碱和次乌头碱3个浓度的批内和批间相对标准偏差(RSD)。

按照“2.4”项处理低、中、高3个浓度的标准含药血浆,并将对应浓度的标准品吹干复溶作为对照品溶液,进样分析,计算提取回收率,结果见表1。

**Table 1** Extraction recovery, inter- and intra-batch precision and accuracy of aconitine, mesaconitine and hypaconitine ( $n = 5$ )

Analyte	$c/$ (ng/mL)	Recovery/ ( $\bar{x} \pm s, \%$ )	Inter-batch		Intra-batch	
			Accuracy/ $\%$	RSD/ $\%$	Accuracy/ $\%$	RSD/ $\%$
Aconitine	0.02	86.5 $\pm$ 9.3	93.6	5.4	94.5	8.0
	0.4	99.7 $\pm$ 13.6	96.3	7.9	97.9	7.3
	2	99.8 $\pm$ 5.2	106.8	5.4	101.8	7.9
Mesaconitine	0.02	86.6 $\pm$ 7.2	93.5	3.1	97.3	8.2
	0.4	94.0 $\pm$ 6.4	93.8	6.5	96.4	9.0
	2	98.6 $\pm$ 7.1	101.7	8.4	96.2	7.7
Hypaconitine	0.02	83.4 $\pm$ 7.8	93.0	5.1	91.9	4.7
	0.4	96.3 $\pm$ 11.0	94.0	8.8	94.0	8.5
	2	106.8 $\pm$ 5.2	107.2	5.0	100.3	7.4

由表 1 可见,乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的准确度、精密度和提取回收率试验的结果均符合生物样品分析要求。

### 3.4 稳定性试验

分别考察了血浆样品室温放置 6 h,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  反复冻融 3 次及  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻放置 1 个月,结果表明样品在储存及测定过程中均稳定。进样器放置

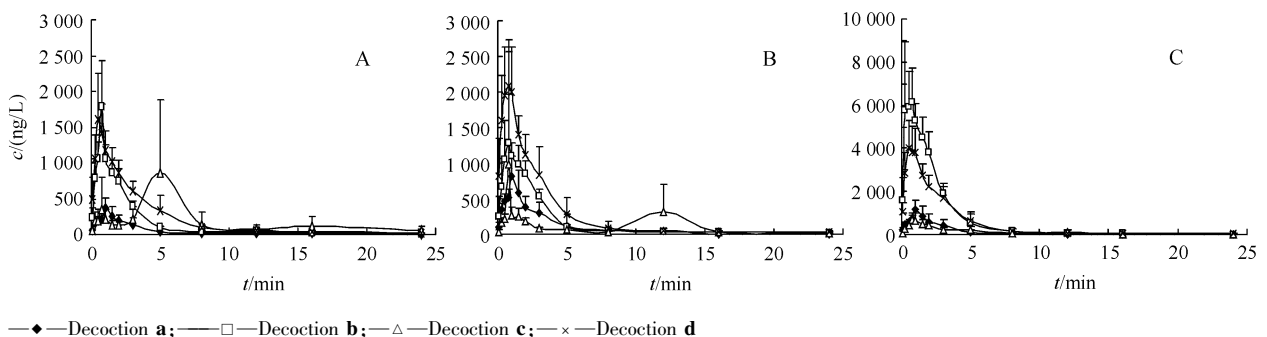
12 h 样品无明显变化。标准工作液及储备液,由于样品在偏酸性的非质子性溶剂中,非常稳定,6 个月内无显著变化。

### 3.5 大鼠体内药动学

采用 DAS 2.0 软件以统计矩法求算相应的药动学参数,结果见表 2。测得的平均血药浓度-时间曲线见图 2。

**Table 2** Estimated pharmacokinetic parameters of aconitine, mesaconitine and hypaconitine after single oral administration of four decoctions respectively to rats ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Analyte	Parameter	Decoction a	Decoction b	Decoction c	Decoction d
Aconitine	$AUC_{0-t}/(\text{ng}\cdot\text{h}/\text{mL})$	908.57 $\pm$ 563.31	3 599.51 $\pm$ 359.90	4 163.78 $\pm$ 3 287.07	5 176.09 $\pm$ 1 169.04
	$MRT_{0-t}/\text{h}$	2.27 $\pm$ 0.70	3.28 $\pm$ 0.39	6.79 $\pm$ 1.44	3.87 $\pm$ 0.75
	$t_{\text{max}}/\text{h}$	1 $\pm$ 0	0.75 $\pm$ 0	3.75 $\pm$ 1.89	0.65 $\pm$ 0.14
	$c_{\text{max}}/(\text{ng}/\text{L})$	363.17 $\pm$ 150.80	1 776.94 $\pm$ 661.72	1 157.14 $\pm$ 834.96	1 736.12 $\pm$ 560.88
	$CL/F/(\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1})$	0.59 $\pm$ 0.27	0.15 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.02	0.22 $\pm$ 0.05
Mesaconitine	$AUC_{0-t}/(\text{ng}\cdot\text{h}/\text{mL})$	2 117.88 $\pm$ 1 169.39	3 714.57 $\pm$ 966.26	1 743.79 $\pm$ 1 537.72	6 186.53 $\pm$ 2 564.30
	$MRT_{0-t}/\text{h}$	2.37 $\pm$ 0.84	2.86 $\pm$ 0.76	5.12 $\pm$ 2.51	2.57 $\pm$ 0.86
	$t_{\text{max}}/\text{h}$	1.1 $\pm$ 0.22	0.85 $\pm$ 0.14	0.9 $\pm$ 0.45	0.8 $\pm$ 0.11
	$c_{\text{max}}/(\text{ng}/\text{L})$	844.54 $\pm$ 321.24	1 383.38 $\pm$ 596.80	1 047.76 $\pm$ 1 555.45	2 176.1 $\pm$ 668.65
	$CL/F/(\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1})$	0.44 $\pm$ 0.24	0.62 $\pm$ 0.18	0.26 $\pm$ 0.14	0.39 $\pm$ 0.18
Hypaconitine	$AUC_{0-t}/(\text{ng}\cdot\text{h}/\text{mL})$	2 737.60 $\pm$ 1 382.81	16 825.71 $\pm$ 3 921.41	2 575.19 $\pm$ 661.50	12 212.7 $\pm$ 3 654.40
	$MRT_{0-t}/\text{h}$	1.99 $\pm$ 0.51	2.42 $\pm$ 0.22	4.3 $\pm$ 2.05	2.62 $\pm$ 0.51
	$t_{\text{max}}/\text{h}$	1.05 $\pm$ 0.27	0.5 $\pm$ 0.25	0.75 $\pm$ 0.31	0.8 $\pm$ 0.21
	$c_{\text{max}}/(\text{ng}/\text{L})$	1 191.28 $\pm$ 454.45	7 684.27 $\pm$ 1 516.12	868.39 $\pm$ 298.32	4 443.06 $\pm$ 1 085.52
	$CL/F/(\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1})$	0.36 $\pm$ 0.17	0.05 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.06



—◆—Decoction a; —□—Decoction b; —△—Decoction c; —×—Decoction d

**Figure 2** Mean plasma concentration-time profiles of aconitine(A), mesaconitine(B) and hypaconitine(C) in rats after oral administration of four decoctions, respectively ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

## 4 讨论

已有文献报道采用固相萃取(SPE)<sup>[7]</sup>、液液萃取(LLE)<sup>[8]</sup>、蛋白沉淀<sup>[9]</sup>等方法处理此类化合物的生物样品。考虑到灵敏度及基质效应问题,蛋白沉淀法未予以考虑,本实验比较了LLE和SPE两种处理方法,SPE法虽可以得到干净的样品,但在低浓度时回收率偏低,LLE法处理样品简单快捷,在比较了乙醚、乙酸乙酯、二氯甲烷等提取溶剂后发现,用乙酸乙酯提取的样品无明显干扰,且回收率较高,在低浓度亦能达到要求,故采用以乙酸乙酯作为提取溶剂的LLE法处理样品。本实验优化了色谱及质谱条件,流动相中含高比例的有机相,使被测物可以有效洗脱并有好的离子化效率;甲酸的加入有利于质谱响应的稳定;被测物为含氮化合物,醋酸铵的加入,可以显著改善色谱峰的峰形。

大鼠经口给予各汤剂后所得的药动学结果表明,药材配伍对药动学参数有影响。大鼠经口给予单味附子汤剂后,其中乌头碱的 $t_{\max}$ 、 $MRT_{0-t}$ 与王朝虹等<sup>[7]</sup>进行的大鼠经口给予乌头碱单体药动学研究所得的结果接近,提示附子药材中共存组分对乌头碱的药动学行为影响不大。乌头碱、新乌头碱、次乌头碱3个成分的药动学行为在同一个汤剂中基本一致,但相同的成分在不同汤剂中则因配伍的影响各不相同。单味附子汤剂给药后乌头碱、新乌头碱、次乌头碱的 $t_{\max}$ 、 $MRT_{0-t}$ 均较短,干姜与附子配伍则使 $t_{\max}$ 、 $MRT_{0-t}$ 有变短的趋势,表明有加快吸收及消除的作用,而四逆汤复方给药后,3个乌头类生物碱 $t_{\max}$ 均延迟,而 $MRT_{0-t}$ 则缩短,可能与中医理论中“得甘草而后缓”有关,消除的加快也可能是减毒的一种途径。实验中还发现,炙甘草与附子配伍后血药浓度-时间曲线出现多峰现象,可能为炙甘草中的组分对乌头类生物碱的吸收产生影响,

这个推论还有待进一步的实验验证。

## 参考文献

- [1] 张仲景(Zhang ZJ). 伤寒论[M]. 北京:中国中医药出版社, 2006:37.
- [2] 李谷霞(Li GX),丁建新(Ding JX),徐万超(Xu WC). 附子不同程度的水解对毒性及药理作用的影响[J]. 重庆医药(*Chongqing Med J*), 1984, **13**(3): 43-46.
- [3] 宋东江(Song DJ),陆满文(Lu MW),李汉青(Li HQ). 乌头碱类化合物毒理学研究概况[J]. 中国药理学通报(*Chin Pharmacol Bull*), 1989, **5**(5): 272-274.
- [4] 陈长勋(Chen CX),金若敏(Jin RM),李仪奎(Li YK),等. 附子和四逆汤表观药动学参数的测定[J]. 中药药理与临床(*Pharmacol Clin Chin Mater Med*), 1989, **5**(2): 8-10.
- [5] 肖凤霞(Xiao FX),周莉玲(Zhou LL),李锐(Li R). 药物累积法测定四逆汤制剂的药动学参数[J]. 时珍国医国药(*Lishizhen Med Mater Med Res*), 2006, **17**(2): 228-229.
- [6] 李锐(Li R),晏亦林(Yan YL),周莉玲(Zhou LL),等. 四逆汤的药动学研究[J]. 中成药(*Chin Tradit Pat Med*), 2002, **24**(10): 777-780.
- [7] 王朝虹(Wang CH),文蛟(Weng J),何毅(He Y). 液相色谱-质谱联用测定乌头碱血药浓度及其药代动力学参数的方法学研究[J]. 分析测试学报(*J Instrum Anal*), 2004, **23**(Z1): 51-53.
- [8] Zhang F, Tang MH, Chen LJ, et al. Simultaneous quantitation of aconitine, mesaconitine, hypaconitine, benzoyleaconine, benzoylmesaconine and benzoylhypaconine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and pharmacokinetics evaluation of "SHEN-FU" injectable powder [J]. *J Chromatogr B*, 2008, **873**(2): 173-179.
- [9] 周娣(Zhou D),潘冠民(Pan GM). 生物检材中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的LC/MS/MS分析[J]. 现代科学仪器(*Mod Sci Instr*), 2005(4): 64-67.
- [10] 张润生(Zhang RS),余琛(Yu C),刘罡一(Liu GY),等. 血液中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的LC/MS/MS分析[J]. 中国法医学杂志(*Chin J Forensic Med*), 2004, **19**(5): 265-267.