

# 给药剂量对附子总生物碱在大鼠体内药代动力学特征的影响

李燕, 赵梦杰, 袁岸, 龚小红, 彭成\*, 李芸霞\*

(成都中医药大学 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室——省部共建  
国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

**[摘要]** 目的:考察不同剂量附子总生物碱在大鼠体内的药动学特征,并探讨剂量与药动学的关系。方法:将大鼠随机均分为低、中、高剂量组,分别按 9.6, 19.2, 38.4 mg·kg<sup>-1</sup> 灌胃附子总生物碱,在 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, 300, 420, 540, 720, 1 440 min 共 14 个时间点眼眶内眦静脉取血,采用 UHPLC-Q-TOF-MS 测定不同时间点血浆中乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和乌头原碱的血药浓度,绘制药-时曲线,计算药动学参数。结果:与低剂量组比较,中、高剂量组上述 7 种生物碱类成分的药峰浓度( $C_{max}$ )和药时曲线下面积  $AUC_{0-\infty}$  升高,大部分差异有统计学意义;表观分布容积/生物利用度( $V_z/F$ ),清除率( $CL$ )/ $F$ ,半衰期( $t_{1/2}$ )和达峰时间( $T_{max}$ )则大部分无明显变化。结论:剂量对附子总生物碱在大鼠体内的药动学特征有显著影响,从低剂量到高剂量的范围内,附子总生物碱的体内过程基本符合线性动力学特征。

**[关键词]** 附子; 总生物碱; 药-时曲线; 双酯型生物碱; 单酯型生物碱; 苯甲酰新乌头原碱

**[中图分类号]** R969.1; R284.1; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)22-0082-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016220082

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160919.1033.008.html>

**[网络出版时间]** 2016-09-19 10:33

## Effect of Dosage on Pharmacokinetic Characteristics of Total Alkaloids from Aconiti Lateralis Radix Praeparata in Rats

LI Yan, ZHAO Meng-jie, YUAN An, GONG Xiao-hong, PENG Cheng\*, LI Yun-xia\*

(Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province, Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore pharmacokinetic characteristics of total alkaloids from Aconiti Lateralis Radix Praeparata with different dosage in rats, and discuss the relationship between the pharmacokinetics and the dosage. **Method:** Rats were randomly divided into the low, medium and high dosage groups by oral administration of total alkaloids from Aconiti Lateralis Radix Praeparata with the dosage of 9.6, 19.2, 38.4 mg·kg<sup>-1</sup>, respectively. A series of blood samples were collected through orbital venae angularis at time points of 0, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, 300, 420, 540, 720, 1 440 min into heparinized tubes. The plasma samples were centrifuged and separated. UHPLC-Q-TOF-MS was established to detect blood drug concentrations of aconitine, mesaconitine, hypaconitine, benzoyleaconitine, benzoylmesaconine, benzoylhypacoitine and aconine at different time points. Several concentration-time curves were drawn and pharmacokinetic parameters were

**[收稿日期]** 20151209(012)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81373943, 81573583); 四川省杰出青年基金项目(2013JQ0018); 四川省科技厅省青年科技创新研究团队专项计划项目(2014TD0007, 2015TD0028)

**[第一作者]** 李燕, 在读博士, 从事中药物质基础以及药动学研究, Tel: 15928979634, E-mail: 993603736@qq.com

**[通讯作者]** \* 彭成, 博士, 教授, 从事疾病动物模型与中药复方研究, Tel: 028-61800018, E-mail: pengchengchengdu@126.com;

\* 李芸霞, 博士, 副教授, 从事中药药效物质基础及其作用、配伍机制研究, Tel: 13699021135, E-mail: lyxcdutcm@126.com

calculated. **Result:** Compared with the low dosage group,  $C_{max}$  and  $AUC_{0-\infty}$  of seven alkaloids in the middle and high dosage groups increased, most of them had significant difference; the majority of  $V_z/F$ ,  $CL/F$ ,  $t_{1/2}$  and  $T_{max}$  did not have significant difference. **Conclusion:** The dosage has a significant impact on pharmacokinetic characteristics of total alkaloids from *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* in rats. In the range of low dosage to high dosage, the process *in vivo* of total alkaloids is basically in line with the linear dynamic characteristics.

[**Key words**] *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*; total alkaloids; mean plasma concentration-time profiles; diester-type alkaloids; monoester-type alkaloids; benzoylmesaconine

附子始载于《神农本草经》,被列为下品,归心、肾、脾经,有毒,具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛的功效<sup>[1]</sup>,常用于亡阳虚脱、四肢厥冷、阳萎尿频、风湿痹痛等证<sup>[2-3]</sup>。其主要有效成分为附子总生物碱,包括乌头碱、新乌头碱、次乌头碱等双酯型生物碱,苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱等单酯型生物碱及乌头原碱<sup>[4]</sup>等醇胺型生物碱。在附子体内药动学研究方面,有采用 HPLC, UPLC, MS, HPLC-UV, HPLC-MS 等<sup>[5-6]</sup>测定附子总生物碱中几种生物碱类成分含量的报道,但多存在样本量大、分析时间长、灵敏度低和特异性差等问题。关于附子煎煮过程中 13 种生物碱含量动态变化规律及附子总生物碱单一剂量给药后 3 种双酯型生物碱药动学的研究亦有报道<sup>[7-8]</sup>,但尚无关于多剂量附子总生物碱的体内药动学研究。本实验采用 UPLC-Q-TOF-MS 研究大鼠灌胃不同剂量附子总生物碱后的药动学特征,探讨剂量对附子总生物碱体内过程的影响,为附子的临床安全应用和合理给药方案制定提供理论依据。

## 1 材料

ACQUITY™ 型超高效液相色谱-SYNAPT G2 型四极杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF-MS, 美国 Waters 公司), Vortex-Genie 2 型涡旋振荡器 (美国 Scientific Industries 公司), Allegra X-30R 型多功能台式离心机 (美国 Beckman Coulter 公司)。附子药材购自四川省江油市,经成都中医药大学药学院裴瑾教授鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* 的子根加工品。附子总生物碱 (成都克洛玛生物科技有限公司,批号 140225),乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、乌头原碱对照品 (成都曼斯特生物科技有限公司,批号分别为 MUST-13012802, MUST-13012207, MUST-13011706, MUST-13052305, MUST-13032801, MUST-13052301, MUST-13051501), 盐酸维拉帕米对照品 (内标,中国食品药品检定研究院,批号 10223-0102),甲酸、乙腈、水为色谱纯,其他试

剂均为分析纯。

清洁级 SD 大鼠,购自成都中医药大学动物中心,许可证号 SYXK (川) 2008-049,雌雄各半,体重 220 ~ 250 g,检疫后用。动物饲养及实验在成都中医药大学国家中医药管理局中药药理科研三级实验室 (TCM-2009-315) 进行。

## 2 方法与结果

### 2.1 检测条件

**2.1.1 色谱条件** ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 流动相乙腈 (A) - 0.1% 甲酸水溶液 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 2 min, 20% A; 2 ~ 6 min, 20% ~ 30% A; 6 ~ 12 min, 30% ~ 45% A; 12 ~ 13 min, 45% ~ 20% A; 13 ~ 15 min, 20% A), 流速 0.25 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 5 μL, 柱温 40 °C, 检测波长 200 ~ 400 nm。

**2.1.2 质谱条件** 电喷雾离子化源 (ESI), 正离子模式检测, 扫描时间 0.2 s, 毛细管电压 2.96 kV, 去溶剂温度 400 °C, 锥孔电压 54 V, 萃取锥孔电压 5 V, 离子源温度 120 °C, 脱溶剂气温度 400 °C, 锥气流速 50 L·h<sup>-1</sup>, 去溶剂气体流速 700 L·h<sup>-1</sup>, 定量检测离子为乌头碱  $m/z$  646.73, 新乌头碱  $m/z$  632.71, 次乌头碱  $m/z$  615.30, 苯甲酰乌头原碱  $m/z$  604.70, 苯甲酰新乌头原碱  $m/z$  590.67, 苯甲酰次乌头原碱  $m/z$  574.29, 乌头原碱  $m/z$  500.60, 内标  $m/z$  455.40。

**2.2 标准溶液的制备** 分别精密称取适量乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、乌头原碱和内标对照品,加乙腈制成 64, 71, 84, 68, 76, 74, 75, 68 mg·L<sup>-1</sup> 的储备液,于 4 °C 冰箱中冷藏。取适量内标储备液用流动相稀释成 0.50 mg·L<sup>-1</sup> 内标溶液。其他对照品储备液用流动相稀释为 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 2 000 μg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

**2.3 血浆样品的制备** 取血浆 90 μL,精密加入混合对照品溶液和内标溶液各 10 μL,涡旋振荡 30 s,加入 10% 氨水 100 μL 和乙酸乙酯 3.5 mL,涡旋振荡 5 min,离心 (12 000 r·min<sup>-1</sup>, 10 min, 下同),取上

清液于 30 ℃ 水浴氮气吹干,残渣加流动相 100 μL 使溶解,涡旋振荡 5 min,离心,取上清液 5 μL 进样。

**2.4 方法学考察** 分别精密吸取 2.2 项下 8 个质量浓度混合对照品溶液制备血浆样品,按 2.1 项下色谱条件测定,以待测物峰面积和内标峰面积的比值为纵坐标,待测物质量浓度为横坐标,得乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和乌头原碱的回归方程分别为  $Y = 0.0251X + 0.0409 (R^2 = 0.9994)$ ,  $Y = 0.0364X + 0.0666 (R^2 = 0.9991)$ ,  $Y = 0.0352X + 0.0726 (R^2 = 0.9992)$ ,  $Y = 0.0347X + 0.0140 (R^2 = 0.9991)$ ,  $Y = 0.0272X + 0.0745 (R^2 = 0.9995)$ ,  $Y = 0.0288X + 0.0445 (R^2 = 0.9991)$ ,  $Y = 0.0058X + 0.0023 (R^2 = 0.9995)$ ,线性范围均为 0.5 ~ 200 μg·L<sup>-1</sup>。另外,选择 50,200,2 000 μg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液制备血浆样品作为质控样品,分别考察 7 个生物碱类成分的精密密度、准确度、回收率、基质效应和稳定性。结果精密密度 RSD 均 < 10%,准确度 RE < 15%,回收率 85% ~ 105%,基质效应在 85% ~ 110%,稳定性 RSD 均 < 15%。

**2.5 药动学研究** 随机选取正常大鼠 18 只,均分为低、中、高剂量组,口服附子总生物碱剂量分别为 9.6,19.2,38.4 mg·kg<sup>-1</sup>,在给药前、给药后 5,10,20,30,40,60,120,180,300,420,540,720,1 440 min 共 14 个时间点眼眶内眦静脉取血 0.25 mL,每次取

血后给大鼠补充等量的生理盐水,于 4 ℃,3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,分离血浆,制备血浆样品,测定血药浓度,绘制药-时曲线,采用 WinNonlin 6.3 软件计算药动学参数,运用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析,以  $\bar{x} \pm s$  表示, $P < 0.05$  为有统计学意义。

结果大鼠灌胃不同剂量附子总生物碱 5 min 后,血浆中便可检测到上述 7 种生物碱类成分,说明吸收较迅速。约 1 h 时血药浓度达峰值,而后快速下降,24 h 时仍可检测到这 7 种生物碱类成分。乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和乌头原碱的低、中、高剂量组的药峰浓度 ( $C_{max}$ ) 分别为 2.68,5.02,9.90 μg·L<sup>-1</sup>; 13.62,22.98,47.76 μg·L<sup>-1</sup>; 5.32,8.55,18.08 μg·L<sup>-1</sup>; 4.06,7.08,13.02 μg·L<sup>-1</sup>; 7.46,10.96,20.64 μg·L<sup>-1</sup>; 67.78,107.55,228.90 μg·L<sup>-1</sup>; 2.52,3.37,6.26 μg·L<sup>-1</sup>。与低剂量组比较,中、高剂量组 7 种生物碱类成分的  $C_{max}$  和药时曲线下面积  $AUC_{0-\infty}$  升高,大部分差异有统计学意义;表观分布容积/生物利用度 ( $V_z/F$ ),清除率 (CL)/ $F$ ,半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 和达峰时间 ( $T_{max}$ ) 则大部分无明显变化。与中剂量组比较,高剂量组上述 7 种生物碱类成分的  $C_{max}$  和  $AUC_{0-\infty}$  明显升高,差异有统计学意义; $V_z/F$ ,CL/ $F$ , $t_{1/2}$  和  $T_{max}$  变化差异无统计学意义。乌头碱、苯甲酰乌头原碱和乌头原碱的药动学参数见表 1,药-时曲线见图 1。

表 1 大鼠口服附子总生物碱后 3 种生物碱类成分的药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Pharmacokinetic parameters of three alkaloids after oral administration of total alkaloids from Aconiti Lateralis Radix Praeparata in rat plasma ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

成分	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	$C_{max}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$AUC_{0-\infty}/\text{h}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$V_z/F/\text{mL}$	$CL/F/\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$	$t_{1/2}/\text{h}$
乌头碱	9.6	2.68 ± 0.55	47.24 ± 5.46	5 249.37 ± 842.66	52.19 ± 16.36	11.63 ± 0.10
	19.2	5.02 ± 0.23 <sup>2)</sup>	81.93 ± 7.20 <sup>1)</sup>	7 569.84 ± 1 204.69	66.47 ± 39.04	11.14 ± 0.25
	38.4	9.90 ± 0.57 <sup>2,3)</sup>	171.63 ± 26.16 <sup>2,3)</sup>	14 191.58 ± 3 888.41 <sup>1)</sup>	93.88 ± 79.66	10.74 ± 0.48
苯甲酰乌头原碱	9.6	4.06 ± 0.25	44.40 ± 7.98	13 638.21 ± 3 362.86	273.09 ± 133.21	10.83 ± 0.80
	19.2	7.08 ± 0.38 <sup>1)</sup>	64.20 ± 12.00 <sup>1)</sup>	15 543.06 ± 5 381.77	301.87 ± 126.30	10.47 ± 1.16
	38.4	13.02 ± 0.53 <sup>2,3)</sup>	154.48 ± 18.35 <sup>2,3)</sup>	16 776.71 ± 4 937.57	308.16 ± 309.18	8.60 ± 0.91
乌头原碱	9.6	2.52 ± 0.41	38.75 ± 6.01	5 078.67 ± 911.35	67.40 ± 20.44	11.29 ± 0.42
	19.2	3.37 ± 1.53	49.88 ± 6.63 <sup>1)</sup>	6 347.67 ± 1 486.43	74.43 ± 56.95	10.95 ± 0.49
	38.4	6.26 ± 1.74 <sup>2,3)</sup>	86.48 ± 24.79 <sup>2,3)</sup>	7 531.68 ± 1 838.50	81.31 ± 48.87	10.12 ± 0.90

注: $T_{max}$  均为 (1.00 ± 0) h。与低剂量组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与中剂量组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

2015 年版《中国药典》规定附子的临床常用剂量为 3 ~ 15 g,本研究选择附子常用剂量 3 g 等效换算为小鼠用量作为低剂量,分别取低剂量的 2,4 倍剂量作为中剂量和高剂量<sup>[9]</sup>。范丽丽等<sup>[10]</sup> 研究表明附子临床有效剂量范围可能为 5.56 ~ 44.44 g·

d<sup>-1</sup>,在此剂量范围内附子的功效随剂量增大而增强,且呈线性相关;当效应达到一定高度时并不会随剂量增大而增强,实验动物出现中毒症状,甚至死亡,提示附子大剂量持续增加时疗效并未随之增强,反而产生明显毒性。附子临床应用时具有明显的量-效-毒关系,用药剂量不可无限制增大。

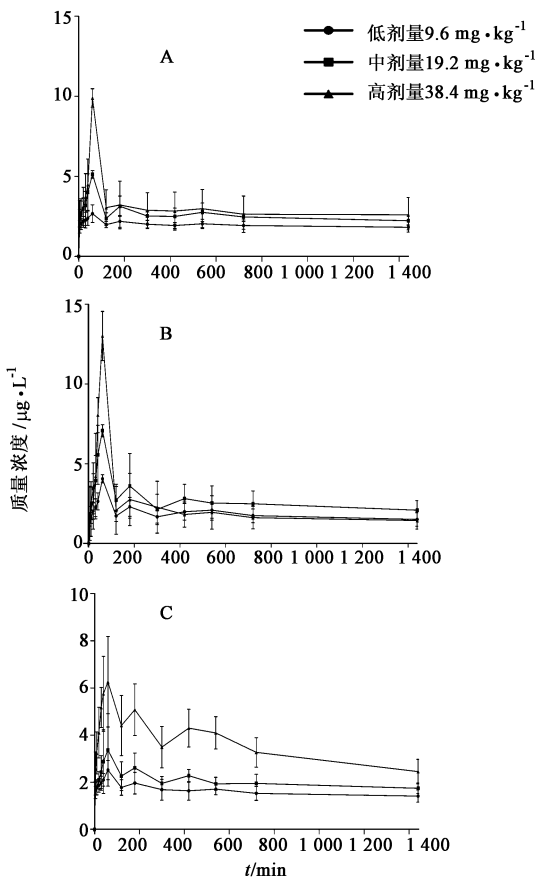


图 1 大鼠口服附子总生物碱后乌头碱 (A), 苯甲酰乌头原碱 (B) 和乌头原碱 (C) 的药-时曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 1 Mean plasma concentration-time profiles of aconitine (A), benzoylaconitine (B) and aconine (C) after oral administration of total alkaloids from *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* in rat plasma ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

附子总生物碱中主要含有双酯型、单酯型和醇胺型生物碱,本研究采用的 UHPLC-Q-TOF-MS 可同时检测这 3 种类型生物碱。结果显示  $C_{max}$  和  $AUC_{0-\infty}$  与给药剂量基本呈线性关系,表明乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱和乌头原碱在大鼠体内的药物动力学呈一级动力学模式。提示在正常大鼠体内,附子总生物碱的药动学过程基本符合线性动力学过程,可为附子临床合理给药方案的确定提供一定的理论依据。

本研究结果提示附子总生物碱可能对大鼠心脏、肝脏、肾脏等均有一定的毒性,随着给药剂量的增加,附子总生物碱在各组织器官的分布增加,但清除不足,从而有可能引起中毒<sup>[11-12]</sup>。选择的 7 种生物碱类成分有多峰现象出现,原因可能是由附子总生物碱的吸收、代谢过程决定,刚开始上述成分均发

生胃、肠黏膜吸收入血,而后双酯型生物碱转化为单酯型生物碱及醇胺型生物碱,单酯型生物碱也可转化为醇胺型生物碱,随着时间的延长,单酯型生物碱、醇胺型生物碱浓度的增加,发生再次吸收,确切机制尚需进一步研究确认。本研究从药动学方面客观分析了附子总生物碱在体内的吸收、分布情况及附子引起急性中毒的原因,为临床发生附子中毒时采取积极有效的措施提供参考,也为临床安全有效地应用附子提供借鉴。综上所述,剂量对附子总生物碱在大鼠体内的药动学特征有显著影响,随给药剂量的增加,附子总生物碱的体内过程基本符合线性动力学特征。

#### [参考文献]

- [1] 边宝林,司南,王宏洁,等. 附子单煎以及与浙贝母合煎后乌头碱、次乌头碱、新乌头碱等有毒成分的含量变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(4): 9-10.
- [2] 张晶,孙桂波,雷崎方,等. 中药附子的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(15): 108-111.
- [3] 吴克红,唐力英,王祝举. 附子的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 91-94.
- [4] 邓雅琼,刘荣华,邵峰,等. 反相高效液相色谱法测定附子中乌头碱等 3 种成分的含量[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1038-1039.
- [5] 肖日平,赖小平,赵亚,等. 附子 6 种生物碱在比格犬体内药动学研究[J]. 中药材, 2014, 37(2): 284-287.
- [6] 武洁,沈红,朱玲英,等. 液-质联用法同时测定大鼠血浆中的乌头碱、新乌头碱、次乌头碱及其药动学[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(14): 1162-1166.
- [7] 张意涵,杨昌林,黄志芳,等. 附子煎煮过程中 13 种生物碱含量的动态变化规律研究[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(1): 16-23.
- [8] 陶长戈,李文军,彭成. 附子总生物碱中乌头碱、新乌头碱、次乌头碱在大鼠体内的药动学研究[J]. 云南中医中药杂志, 2011, 32(3): 49-52.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 191-193.
- [10] 范丽丽,郑作文,杨柯,等. 毒性中药附子量效关系的实验研究[J]. 四川中医, 2011, 29(5): 53-57.
- [11] 杨卓. 附子煎煮时间、给药剂量与毒性的相关性研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2005.
- [12] 沈玉巧,林华,邓广海,等. 不同炮制工艺附子煎煮液的急性毒性探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(12): 121-124.

[责任编辑 刘德文]