

# UPLC-MS/MS 测定十五味乳鹏丸中 3 种生物碱在大鼠体内的药代动力学

张武岗<sup>1</sup>, 占远<sup>1,2</sup>, 冯育林<sup>1</sup>, 杨婕<sup>1\*</sup>, 陈海芳<sup>1\*</sup>, 杨世林<sup>1</sup>

(1. 江西中医药大学 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006;

2. 贵州医科大学, 贵阳 550004)

**[摘要]** **目的:**采用超高效液相色谱质谱联用法测定大鼠灌胃十五味乳鹏丸后体内 3 种生物碱(乌头碱、新乌头碱、次乌头碱)的血浆药物浓度并进行药代动力学参数评价。**方法:**Welch UPLC XB-C<sub>18</sub> 色谱柱(2.0 mm × 50 mm, 1.7 μm), 乙腈-0.1% 甲酸水溶液梯度洗脱, 流速 0.35 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 40 °C, 进样量 5 μL, 采用电喷雾正离子化质谱法监测血浆中各成分的浓度。**结果:**乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的线性范围分别为分别在 126.56 ~ 10 125, 18.75 ~ 1 500, 16.32 ~ 1 305.5 ng·L<sup>-1</sup>。3 种生物碱在大鼠体内的主要药代动力学参数药峰浓度( $C_{max}$ )分别为(0.75 ± 0.14), (0.23 ± 0.03), (0.17 ± 0.02) μg·L<sup>-1</sup>, 消除半衰期( $t_{1/2}$ )分别为(2.93 ± 1.72), (3.02 ± 1.60), (3.70 ± 2.63) h, 药时曲线下面积 AUC<sub>0-∞</sub> 分别为(5.03 ± 1.37), (1.51 ± 0.26), (1.14 ± 0.21) h·μg·L<sup>-1</sup>。**结论:**该方法快速、准确、灵敏, 可用于该类成分的血药浓度测定及其药代动力学研究, 为十五味乳鹏丸的体内研究提供参考。

**[关键词]** 十五味乳鹏丸; 乌头碱; 新乌头碱; 次乌头碱; 药代动力学; 盐酸小檗碱

**[中图分类号]** R969.1; R945; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)24-0095-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016240095

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160928.1617.016.html>

**[网络出版时间]** 2016-09-28 16:17

## Pharmacokinetics of Three Alkaloids from Shiwuwei Rupeng Pills in Rats by UPLC-MS/MS

ZHANG Wu-gang<sup>1</sup>, ZHAN Yuan<sup>1,2</sup>, FENG Yu-lin<sup>1</sup>, YANG Jie<sup>1\*</sup>, CHEN Hai-fang<sup>1\*</sup>, YANG Shi-lin<sup>1</sup>

(1. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Materia Medica, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China;

2. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

**[Abstract]** **Objective:** The contents of aconitine, mesaconitine and hypaconitine in rat plasma were determined by UPLC-MS/MS after oral administration of Shiwuwei Rupeng pills, and pharmacokinetics of these three alkaloids in rats was investigated. **Method:** The separation was carried out on Welch UPLC XB-C<sub>18</sub> column (2.0 mm × 50 mm, 1.7 μm), mobile phase was acetonitrile-0.1% formic acid in water for gradient elution, flow rate was 0.35 mL·min<sup>-1</sup>. Electrospray ionization (ESI) source was applied and operated in the positive ion mode. **Result:** The linear ranges of aconitine, mesaconitine and hypaconitine were 126.56-10 125, 18.75-1 500, 16.32-1 305.5 ng·L<sup>-1</sup>, respectively. The main pharmacokinetic parameters of aconitine, mesaconitine and hypaconitine were obtained as follows:  $C_{max}$  of (0.75 ± 0.14), (0.23 ± 0.03), (0.17 ± 0.02) μg·L<sup>-1</sup>,  $t_{1/2}$  of

**[收稿日期]** 20160120(004)

**[基金项目]** 江西民族传统药现代科技与产业发展协同创新中心开放基金项目(JXXT201402008)

**[第一作者]** 张武岗, 博士, 副教授, 从事天然药物活性成分研究, Tel:0791-87119632, E-mail:zwgchf98@foxmail.com

**[通讯作者]** \* 杨婕, 硕士, 副教授, 从事药物化学研究, Tel:0791-87119632, E-mail:760643104@qq.com;

\* 陈海芳, 硕士, 讲师, 从事新药分析研究, Tel:0791-87119632, E-mail:Chenhf88@126.com

( $2.93 \pm 1.72$ ), ( $3.02 \pm 1.60$ ), ( $3.70 \pm 2.63$ ) h,  $AUC_{0\sim t}$  of ( $5.03 \pm 1.37$ ), ( $1.51 \pm 0.26$ ), ( $1.14 \pm 0.21$ )  $h \cdot \mu g \cdot L^{-1}$ . **Conclusion:** This method is rapid, accurate and sensitive, and it can be used for pharmacokinetic study of such alkaloids, which provides pharmacokinetic evidence for *in vivo* study of Shiwuwei Rupeng pills.

[**Key words**] Shiwuwei Rupeng pills; aconitine; mesaconitine; hyaconitine; pharmacokinetics; berberine hydrochloride

十五味乳鹏丸收载于《卫生部药品标准》(藏药)第一册和王宝勤主编的《国家藏药标准全书》,具有消炎止痛、干黄水的功效,用于治疗关节红肿疼痛、发痒、痛风、黄水积聚,是藏族医生用于治疗痛风类疾病的常用药。该方由乳香、宽筋藤、决明子、渣驯膏、黄葵子、藏菖蒲、铁棒锤等 15 味药材组成。铁棒锤(榜阿那保)是该复方治疗痛风性疼痛的主要止痛药材,该药材收载于 1993 年版《宁夏中药材标准》,含有乌头碱、去氧乌头碱、伏乌碱、纳派林碱和 3-乙酰乌头碱等生物碱类成分;铁棒锤总生物碱小鼠腹腔注射半数致死量  $1.09 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,而且乌头碱类成分安全范围窄,治疗量与中毒量接近,同时由于患者的个体差异,对其耐受性不一,中毒也无特异性临床表现,故难以进行中毒鉴别<sup>[1]</sup>。为了临床上更安全地使用十五味乳鹏丸,扩大该制剂的应用区域,必须对这些乌头类生物碱类毒性成分进行严格监控。虽然生物样本中乌头类生物碱的测定已有多篇文献报道<sup>[2-7]</sup>,但关于十五味乳鹏丸中乌头类生物碱的体内研究尚未见报道。本实验拟建立 UPLC-MS/MS 同时测定血浆中乌头类生物碱的含量,研究大鼠口服十五味乳鹏丸后乌头类生物碱的药代动力学过程,为该制剂的安全性评价奠定基础。

## 1 材料

6460 型三重串联四级杆质谱仪和 1290 型超高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),AL204 型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],HC-3018R 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司),Vortex 3 型旋涡混匀器(德国 IKA 公司),Simplicity 型超纯水处理系统(美国密理博公司)。

十五味乳鹏丸(甘南佛阁藏药有限公司,批号 20120227),乌头碱对照品(成都克洛玛生物科技有限公司,批号 140823),新乌头碱、次乌头碱、盐酸小檗碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110799-201307, 110798-201308, 110713-201212,纯度均  $> 98\%$ ),水为超纯水,乙腈为色谱纯,其他

试剂均为分析纯。

雄性 SD 大鼠,清洁 II 级,体重  $180 \sim 220 \text{ g}$ ,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(湘)2011-0003。大鼠适应性喂养 1 周后开始实验,大鼠给药前禁食 12 h,自由饮水。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Welch UPLC XB-C<sub>18</sub> 色谱柱( $2.0 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}, 1.7 \mu\text{m}$ ),乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱( $0 \sim 1.4 \text{ min}, 90\% \text{ B}; 1.4 \sim 2.6 \text{ min}, 90\% \sim 45\% \text{ B}; 2.6 \sim 3.2 \text{ min}, 45\% \sim 5\% \text{ B}; 3.2 \sim 7.0 \text{ min}, 5\% \text{ B}$ ),流速  $0.35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,柱温  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,进样量  $5 \mu\text{L}$ 。

**2.2 质谱条件** 电喷雾离子源,正离子检测,高纯氮气为质谱用气,气体温度  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ ,干燥气流量  $5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ,雾化器压力  $0.31 \text{ MPa}$ ,鞘流气流量  $11 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ,扫描模式为多反应监测,用于定量反应的离子分别为  $m/z 646.6 \sim 586.5$ (乌头碱), $m/z 632.3 \sim 572.3$ (新乌头碱), $m/z 616.3 \sim 556.2$ (次乌头碱)和  $m/z 336.1 \sim 320.1$ (盐酸小檗碱)。

**2.3 溶液配制** 精密称取对照品适量,加甲醇溶解,制成乌头碱、新乌头碱、次乌头碱质量浓度分别为  $0.486, 0.216, 0.470 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的混合对照品储备液,用甲醇稀释成系列混合对照品溶液,置于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存备用。精密称取盐酸小檗碱适量,加甲醇制成  $0.62 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  内标溶液,置于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存备用。

**2.4 受试大鼠给药方案** SD 大鼠 6 只,禁食过夜至少 10 h(自由饮水),于次日早晨以  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃十五味乳鹏丸药粉溶液,给药剂量  $2.41 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,分别于给药前及给药后 10, 20, 30, 50, 70 min 和 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12, 36 h 眼底静脉丛取血  $300 \mu\text{L}$ ,分离血浆,每次取血后给大鼠补充等量生理盐水。

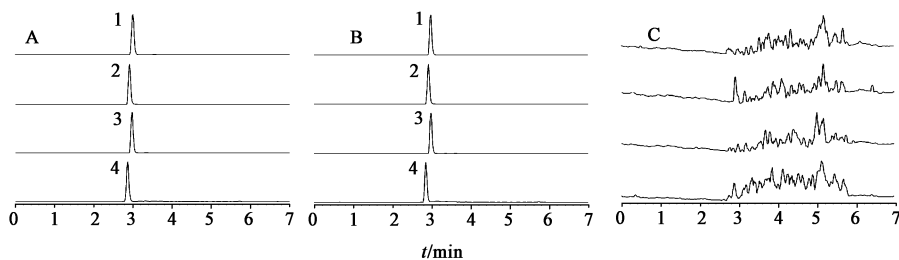
**2.5 血浆样品处理** 精密吸取血浆样品  $100 \mu\text{L}$ ,加入内标溶液  $20 \mu\text{L}$ ,加入乙腈  $280 \mu\text{L}$ ,涡旋 2 min,  $16000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清液进样分析。

## 2.6 方法学验证

**2.6.1 专属性考察** 取大鼠的空白血浆  $100 \mu\text{L}$ ,

取空白血浆 100  $\mu\text{L}$  加入一定浓度的混合对照品溶液和内标溶液,取大鼠给药后血浆样品适量,按 2.5 项下方法操作,将 3 种样品进行 UPLC-MS/MS 分

析,见图 1。结果发现内标和混合对照品可实现完全分离,血浆中内源性物质和代谢物不干扰混合对照品的测定。



A. 供试品; B. 空白血浆 + 对照品; C. 空白血浆; 1. 乌头碱; 2. 新乌头碱; 3. 次乌头碱; 4. 盐酸小檗碱

图 1 大鼠灌胃五味乳鹏丸后血浆样品 UPLC-MS/MS

Fig. 1 UPLC-MS/MS chromatograms of plasma samples after oral administration of Shiwuwei Rupeng pills

**2.6.2 线性关系考察** 分别精密吸取系列质量浓度的混合对照品溶液 20  $\mu\text{L}$ , 加入至 100  $\mu\text{L}$  大鼠空白血浆中, 按 2.5 项下方法操作, 以待测物质量浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标, 运用加权最小二乘法进行回归运算, 得乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的标准曲线分别为  $Y = 1.875 2X + 78.111 (R^2 = 0.991 8)$ ,  $Y = 0.003 5X + 0.005 (R^2 = 0.997 0)$ ,  $Y = 0.003 6X + 0.004 (R^2 = 0.999 4)$ , 线性范围依次为 126.56 ~ 10 125, 18.75 ~ 1 500, 16.32 ~ 1 305.5  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ , 最低定量限 (信噪比  $S/N \geq 10$ ) 分别为 126.56, 18.75, 16.32  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.6.3 精密度和准确度** 取空白血浆 100  $\mu\text{L}$ , 加入混合对照品溶液适量, 配制低、中、高 (乌头碱 2 025.0, 5 062.5, 8 100.0  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ , 次乌头碱 261.10, 652.75, 1 044.40  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ , 新乌头碱 300, 750, 1 200  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 质量浓度的血浆样品, 连续测定 3 d, 精密度以 RSD 表示, 准确度以相对误差 (RE) 表示。结果 RSD 和 RE 均  $< 7.5\%$ , 见表 1。

**2.6.4 提取回收率考察** 取大鼠空白血浆, 加入混合对照品溶液适量, 配制低、中、高 (乌头碱 506.25, 4 050.00, 9 112.50  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ , 次乌头碱 65.28, 522.00, 1 174.95  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ , 新乌头碱 75, 600, 1 350  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 质量浓度的质控样品。另取大鼠空白血浆, 按 2.5 项下方法处理, 加入相应质量浓度的乌头碱、次乌头碱和新乌头碱混合对照品溶液。计算提取回收率, 见表 2。

**2.6.5 基质效应** 取 2.6.4 项下的低、中、高质量浓度的质控样品, 另取相应质量浓度的乌头碱、新乌头碱和次乌头碱混合对照品溶液, 计算基质效应, 见表 2。

**2.7 药代动力学研究** 采用 WinNonlin 5.2 软件以

表 1 血浆样品中乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的精密度与准确度 ( $n = 6$ )

Table 1 Precision and accuracy of aconitine, mesaconitine and hyaconitine in rat plasma ( $n = 6$ ) %

成分	质量浓度 $/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	RE		RSD	
		日内	日间	日内	日间
乌头碱	2 025.00	6.2	7.1	3.6	4.5
	5 062.50	4.9	6.9	2.7	3.6
	8 100.00	2.5	3.9	1.3	2.9
次乌头碱	261.10	5.4	6.9	3.6	5.7
	652.75	4.7	5.5	2.8	4.1
	1 044.40	1.6	2.1	2.4	3.1
新乌头碱	300.00	3.8	4.7	3.6	5.0
	750.00	2.4	4.2	2.8	4.1
	1 200.00	0.9	1.9	1.7	2.4

表 2 血浆样品中乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的基质效应和提取回收率 ( $n = 6$ )

Table 2 Matrix effects and extraction recoveries of aconitine, mesaconitine and hyaconitine in rat plasma ( $n = 6$ ) %

生物碱	质量浓度 $/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	提取回收率		基质效应	
		平均值	RSD	平均值	RSD
乌头碱	506.25	87.00	2.1	77.10	1.6
	4 050.00	98.14	1.2	97.75	0.6
	9 112.50	99.48	0.8	98.92	0.5
次乌头碱	65.28	86.45	2.8	85.83	3.1
	522.00	97.21	1.3	96.57	0.9
	1 174.95	98.84	0.9	99.74	0.6
新乌头碱	75.00	84.84	2.4	86.46	2.4
	600.00	96.78	1.4	98.16	1.0
	1 350.00	98.55	0.9	99.40	0.5

统计矩方法求算大鼠单剂量口服五味乳鹏丸后乌头碱、新乌头碱、次乌头碱的药动学参数, 结果见表 3, 以 Sigmaplot 10.0 软件作药-时曲线, 见图 2。

### 3 讨论

五味乳鹏丸处方中铁棒锤具有祛风止痛、散

表 3 十五味乳鹏丸给药后乌头碱、新乌头碱、次乌头碱的主要药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 3 Main pharmacokinetic parameters of aconitine, mesaconitine and hypaconitine after oral administration of Shiwuwei Rupeng pills ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

参数	乌头碱	新乌头碱	次乌头碱
$C_{max}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.75 ± 0.14	0.23 ± 0.03	0.17 ± 0.02
$T_{max}/\text{h}$	2.42 ± 0.97	2.58 ± 0.97	2.42 ± 0.97
$AUC_{0-t}/\text{h}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	5.03 ± 1.37	1.51 ± 0.26	1.14 ± 0.21
$AUC_{0-\infty}/\text{h}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	5.78 ± 1.93	1.73 ± 0.41	1.27 ± 0.25
$MRT_{0-t}/\text{h}$	4.74 ± 0.46	4.71 ± 0.44	4.76 ± 0.50
$t_{1/2}/\text{h}$	2.93 ± 1.72	3.02 ± 1.60	3.70 ± 2.63

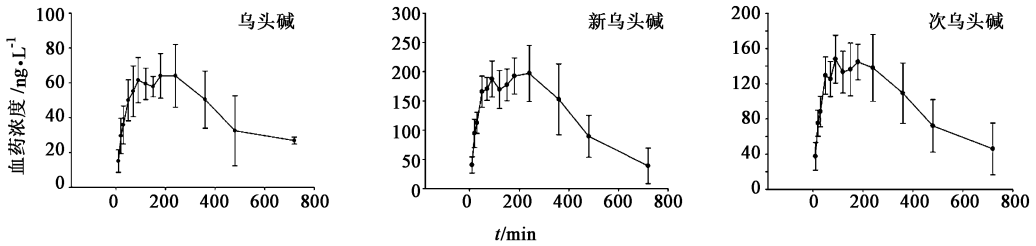


图 2 十五味乳鹏丸给药后各成分的平均血药浓度-时间曲线 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 2 Average plasma concentration-time curves of three alkaloids after oral administration of Shiwuwei Rupeng pills ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

武洁等<sup>[8]</sup>研究发现 3 种二萜双酯型生物碱类(乌头碱、新乌头碱、次乌头碱)在大鼠血浆中检测限  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本文采用 UPLC-MS/MS, 流动相系统为乙腈-0.1% 甲酸水溶液, 建立了大鼠血浆中 3 种乌头碱类成分的测定方法, 结果将大鼠血浆中这 3 种成分的检测限调整至  $16.32 \sim 126.56 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ , 大大降低了定量下限, 提高了检测灵敏度。大鼠单剂量口服十五味乳鹏丸后 3 种乌头碱类成分在大鼠体内的达峰时间约 2.5 h, 其中乌头碱的峰浓度最高。新乌头碱、乌头碱和次乌头碱的消除半衰期为 2.93 ~ 3.70, 提示 3 种成分在大鼠体内能较快的消除。但与文献报道比较, 本实验中大鼠单剂量经口给予十五味乳鹏丸后, 药-时曲线不规则, 有双峰现象, 提示十五味乳鹏丸中 3 种乌头碱类成分在体内产生了肝肠循环或分布重吸收等行为, 与文献<sup>[9]</sup>报道一致。

[参考文献]

[1] 邢世瑞. 宁夏中药材标准[M]. 银川: 宁夏人民出版社, 1993: 142-150.  
 [2] 王朝虹, 文蛟, 何毅. 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, 2004, 23(S1): 51-53.  
 [3] 张泉龙. 乌头碱经皮给药药代动力学和药效动力学

瘀止血、消肿拔毒的功效, 是本处方的主要止痛药物。因此了解该药中乌头碱类生物碱的含量及其药理、毒性作用机制, 特别是进行基于药效和毒理的体内过程研究, 对于指导临床用药、降低用药过程中的毒副作用具有重要意义。易进海等<sup>[6]</sup>采用 RP-HPLC 测得该药中生物碱(以乌头碱计)质量分数  $0.066 \sim 0.081 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。以此质量分数计算本实验给药剂量 ( $2.41 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 中乌头碱类生物碱质量分数  $0.159 \sim 0.195 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 低于 1993 年版《宁夏中药材标准》中记载铁棒锤总生物碱小鼠腹腔注射的半数致死量, 而且在本研究过程 6 只大鼠均未表现出任何中毒反应, 该剂量将为十五味乳鹏丸后续的体内安全性研究提供参考依据。

结合研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2009.

[4] 王志琪, 景贤, 曾嵘, 等. LC-MS/MS 测定大鼠血浆中乌头碱的浓度[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(4): 371-375.  
 [5] 邱俏檬, 梁欢, 洪广亮, 等. 兔急性草乌中毒血液灌流后的毒代动力学研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14(5): 551-556.  
 [6] 易进海, 陈燕, 刘玉红, 等. RP-HPLC 测定十五味乳鹏胶囊中酯型生物碱的含量[J]. 中成药, 2002, 24(8): 586-588.  
 [7] 辛杨, 张滢, 张哲, 等. 液质联用技术分析次乌头碱在大鼠尿液中的代谢产物[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(4): 94-97.  
 [8] 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.  
 [9] Deng Y T, Liao Q F, Li S H, et al. Simultaneous determination of berberine, palmatine and jatrorrhizine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in rat plasma and its application in a pharmacokinetic study after oral administration of coptis-evodia herb couple [J]. J Chromatogr B, 2008, 863(2): 195-205.

[责任编辑 刘德文]