

· 药物代谢 ·

## 炼蜜用量对附子理中丸中9种生物碱类成分 药代动力学的影响

甘嘉荷<sup>1</sup>, 王淳<sup>1</sup>, 宋志前<sup>1</sup>, 刘元艳<sup>2</sup>, 宁张弛<sup>1</sup>, 马新玲<sup>1</sup>, 赵思宇<sup>2</sup>, 刘振丽<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院 中医基础理论研究所, 北京 100700;

2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102)

**[摘要]** **目的:**建立大鼠口服附子理中丸2种剂型后不同时间点血浆中9种生物碱类成分含量的测定方法,考察辅料炼蜜对附子中主要生物碱类成分药代动力学行为的影响。**方法:**SD大鼠分别给予2种含炼蜜量不同的附子理中丸大蜜丸(19.44 g·kg<sup>-1</sup>)和水蜜丸(19.22 g·kg<sup>-1</sup>),于给药后不同时间点取血,采用RRLC-TQ-MS测定血浆中9种生物碱类成分的血药浓度,绘制血药浓度-时间曲线,计算药物动力学参数。**结果:**在大鼠血浆中检测到9种生物碱中的8种。双酯型生物碱乌头碱、新乌头碱、次乌头碱的药-时曲线下面积(AUC),药峰浓度(C<sub>max</sub>),达峰时间(T<sub>max</sub>)和半衰期(t<sub>1/2</sub>)均为大蜜丸>水蜜丸,而清除率(CL)为大蜜丸<水蜜丸;单酯型生物碱苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱的AUC, T<sub>max</sub>和t<sub>1/2</sub>均为大蜜丸<水蜜丸,而C<sub>max</sub>和CL为大蜜丸>水蜜丸,苯甲酰乌头原碱未被检测到;醇胺型生物碱乌头原碱、新乌头原碱和次乌头原碱的AUC, T<sub>max</sub>和t<sub>1/2</sub>均为大蜜丸<水蜜丸,而C<sub>max</sub>和CL为大蜜丸>水蜜丸。**结论:**炼蜜能够影响附子理中丸中制附子主要生物碱成分的药动学特征,炼蜜量大的大蜜丸与炼蜜量小的水蜜丸比较,作为制附子的特征性标志物双酯型生物碱在体内达到药峰时间延长,消除速度减慢,提示炼蜜在复方中能够起到延缓吸收的作用。

**[关键词]** 药物动力学; 炼蜜; 附子理中丸; 双酯型生物碱; 单酯型生物碱; 醇胺型生物碱; 快速液相色谱串联质谱

**[中图分类号]** R969.1;R945;R285.5;R284;R283.6;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)03-0090-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2018030090

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171011.1418.046.html>

**[网络出版时间]** 2017-10-11 14:18

### Effect of Refined Honey Amount on Pharmacokinetics of 9 Different Alkaloids in Fuzi Lizhongwan

GAN Jia-he<sup>1</sup>, WANG Chun<sup>1</sup>, SONG Zhi-qian<sup>1</sup>, LIU Yuan-yan<sup>2</sup>, NING Zhang-chi<sup>1</sup>,  
MA Xin-ling<sup>1</sup>, ZHAO Si-yu<sup>2</sup>, LIU Zhen-li<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Basic Theory of Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for the determination of nine alkaloids in plasma at different time points after oral administration of two dosage forms of Fuzi Lizhongwan, in order to determine refined honey whether have any impact on the pharmacokinetic behavior of the main alkaloids. **Method:** SD rats were given two different kinds of Fuzi Lizhongwan (big honeyed pill of 19.44 g·kg<sup>-1</sup> and water-honeyed pill of 19.22 g·kg<sup>-1</sup>) with different amount of honey. Blood concentrations were measured at different time points after administration, and the concentrations of 9 alkaloids in the plasma were determined by RRLC-TQ-MS. The plasma concentration-

**[收稿日期]** 20170719(015)

**[基金项目]** 中央级科研院所自主选题项目(YZ-1542)

**[第一作者]** 甘嘉荷,在读硕士,从事中药药效物质基础及质量评价工作,Tel:15210013986,E-mail:175185723@qq.com

**[通信作者]** \*刘振丽,博士,研究员,从事中药药效物质基础及质量评价工作,Tel:010-64089059,E-mail:zhenli\_liu@sina.com

time curves were drawn and the pharmacokinetic parameters were calculated. **Result:** Eight of nine alkaloids were detected in rat plasma. For diester alkaloids, the AUC,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$  and  $t_{1/2}$  of aconitine, mesaconitine and hyaconitine were big honeyed pill > water-honeyed pill, and clearance rate (CL) was the big honeyed pill < water-honeyed pill. For monoester alkaloids, the AUC,  $T_{max}$  and  $t_{1/2}$  of benzoylmesaconine and benzoylhyaconine were big honeyed pill < water-honeyed pill, and  $C_{max}$  and CL were big honeyed pill > water-honeyed pill. Benzoylaconine was not detected. For alcohol amine alkaloids, the AUC,  $T_{max}$  and  $t_{1/2}$  of aconine, mesaconine and hyaconine were big honeyed pill < water-honeyed pill, and  $C_{max}$  and CL were big honeyed pill > water-honeyed pill. **Conclusion:** The refined honey can affect the pharmacokinetic characteristics of the main alkaloid components in Fuzi Lizhongwan. Compared with the water-honeyed pill, times to peak of diester alkaloids in big honeyed pill are extended and the elimination rates are slowed down, which suggesting that refined honey in the formula can play a role in delaying absorption.

[**Key words**] pharmacokinetics; refined honey; Fuzi Lizhongwan; diester alkaloids; monoester alkaloids; alcohol amine alkaloids; RRLC-TQ-MS

丸剂是中医复方中较为常用的传统剂型之一,始见于《五十二病方》。“丸者,缓也”,既是历史医书对丸剂特点的描述,也是对丸剂使用要求的要求。如《汤液本草》的“……圆者,缓也,不能速去之,其用药之舒缓而治之意也。”李东垣指出:“水浸宿,炊饼,又易化;滴水丸,又易化,炼蜜丸者,取其迟化而气循经络也”,即相对于水丸,蜜丸因加入了黏合剂炼蜜,发挥疗效相对迟缓。附子理中丸是临床常用的中药复方,其出自《太平惠民和剂局方》,具有温中健脾的功效。该方亦收载于 2015 年版《中国药典》,是由附子(制),干姜,炒白术,党参和甘草共 5 味中药组成<sup>[1]</sup>,临床应用有不同剂型,包括大蜜丸、水蜜丸等。大蜜丸是饮片细粉以炼蜜为黏合剂制成,水蜜丸是饮片细粉以水和蜂蜜适当比例混匀为黏合剂制成。附子为方中君药,但其属于有毒中药,尽管使用炮制品后有毒成分大大降低,但不时仍有临床报道服用附子理中丸出现中毒现象<sup>[2-4]</sup>。附子所含的双酯型生物碱(主要包括乌头碱、新乌头碱和次乌头碱)是目前公认具有代表性的有毒成分,通过炮制<sup>[5]</sup>和药味配伍可起到减毒作用<sup>[6-8]</sup>,同时有研究推测炼蜜的加入也可以起到配伍减毒的作用<sup>[9]</sup>,但缺少一定的科学依据。

药物代谢动力学是研究和阐明药物在体内的吸收、分布、代谢以及排泄等过程,利用药动学分析给药后的动物血浆,可了解药物成分在体内的浓度变化情况<sup>[10]</sup>,计算相关药动学参数,从而阐明药物的作用机制。有关附子中主要生物碱类成分在单味药、药对或复方中的药代动力学研究已经有报道<sup>[11-14]</sup>,但关于炼蜜是否对附子中生物碱类成分的药动学特征有影响的研究尚未见报道。本实验选择

附子理中大蜜丸和附子理中水蜜丸 2 种剂型进行对比,这 2 种剂型的区别在于炼蜜的用量,大蜜丸的炼蜜用量是水蜜丸的 2 倍,通过研究这 2 种剂型给药后 9 种附子生物碱类成分的入血吸收情况及入血吸收前后浓度随时间的变化情况,来分析炼蜜对附子理中丸中生物碱类毒性成分的影响,为阐明“丸者,缓也”的作用机制提供参考。

## 1 材料

1260 系列高效液相色谱仪(包括 G1322A 型脱气机, G1311A 型四元泵, G1313A 型自动进样器, G1316A 型恒温箱)和 G6410AQQQ 型质谱仪(美国安捷伦公司), UGC-24C 型氮吹仪(北京优晟联合科技有限公司), 3K15 型高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司), XW-80A 型旋涡混合器(上海精科实业有限公司), CP225D 型 1/10 万电子天平(德国赛多利斯公司)。

饮片黑顺片(批号 01103922,产地四川)购于北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司;干姜(批号 150821011,产地四川),党参(批号 151012008,产地山西),白术(批号 131026001,产地浙江)和甘草(批号 130101012,产地新疆)均购于北京仟草中药饮片有限公司;均经北京中医药大学刘春生教授鉴定,分别为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* 的子根的加工品、姜科植物姜 *Zingiber officinale* 的干燥根茎、桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* 的干燥根、菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* 的干燥根茎、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根和根茎。附子理中大蜜丸和附子理中水蜜丸为本实验室按 2015 年版《中国药典》(一部)的工艺制备而成,乌头碱、新乌头碱、次乌头碱对照品(中国食品药品检

定研究院,批号分别为 110720-200410, 110799-200404, 110798-200404, 纯度均 > 98%), 乌头原碱、新乌头原碱、次乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱(成都曼斯特生物科技有限公司,批号分别为 MUST-14121101, MUST-15010610, MUST-14123010, MUST-14032209, MUST-14062208, MUST-14032209, 纯度分别为 99.23%, 99.08%, 99.47%, 98%, >98%, >98%), 水为超纯水, 乙腈、甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 18 只, 体重 180 g ~ 220 g, 由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 合格证号 SCXK-(军)2012-0004。本实验经中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物伦理委员会批准, 批准号 20150510。

## 2 方法与结果

**2.1 附子理中大蜜丸与水蜜丸的制备** 按处方比例称取黑顺片、干姜、党参、白术和甘草饮片适量, 粉碎, 过五号筛, 得细粉, 混匀, 均分为 2 份, 备用。将蜂蜜放入锅中, 加热, 待温度达到 116 ~ 118 °C, 出现浅黄色有光泽的均匀小泡, 呈鱼眼泡状, 且用手捻之多有黏性, 两手指打开时无长白丝出现, 滴水不散时, 即成炼蜜。按附子理中大蜜丸制备工艺, 分别取饮片细粉与炼蜜趁热混匀, 制成大蜜丸。将等量蜂蜜与水放入锅中, 其余操作同上制备炼蜜, 按附子理中水蜜丸制备工艺, 分别取饮片细粉与炼蜜和水趁热混匀, 制成水蜜丸。

**2.2 检测条件** 采用 Accucore RP-MS 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 2.6 μm), 流动相 0.1% 甲酸水溶液 (A)-0.1% 甲酸乙腈溶液 (B) (0 ~ 3 min, 15% ~ 55% B; 3 ~ 9 min, 55% B; 9 ~ 12 min, 55% ~ 80% B; 12 ~ 12.01 min, 80% ~ 100% B; 12.01 ~ 13 min, 100% B), 流速 0.3 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C。质谱条件为正离子检测模式, 电喷雾电离源 (ESI), 扫描方式为多反应离子监测模式 (MRM), 各化合物的质谱信息见表 1。

**2.3 对照品溶液的制备** 分别精密称取乌头原碱、新乌头原碱、次乌头原碱、乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱对照品适量, 分别加甲醇制成质量浓度为 0.272, 0.192, 0.266, 0.005 68, 0.208, 0.013 2, 0.052, 0.066, 0.054 g · L<sup>-1</sup> 的对照品储备液。分别精密吸取上述 9 个对照品储备液适量, 混合, 加甲醇定容, 得质量浓度分别为 1.36, 0.96, 1.33, 0.028 4, 0.52, 0.066, 0.012 48, 0.22, 0.054 mg · L<sup>-1</sup> 的混合

表 1 9 种生物碱成分的多反应监测模式信息

Table 1 MRM information of 9 different alkaloids

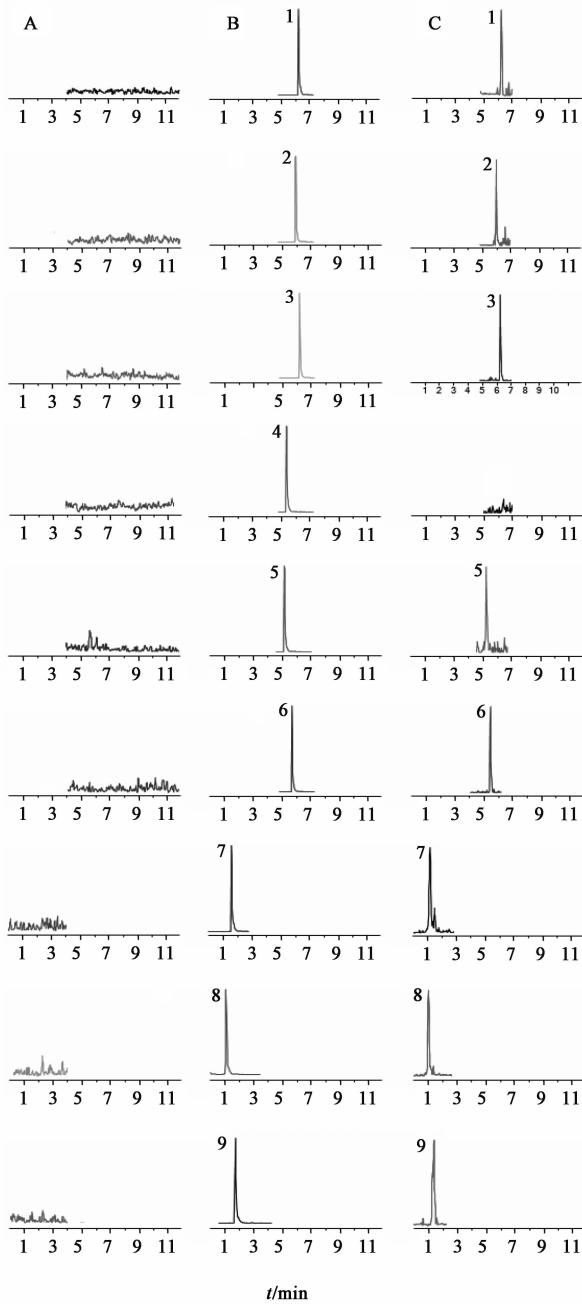
化合物	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	碎裂电压 /V	碰撞能量 /eV
乌头原碱	500.3	450.3	125	35
新乌头原碱	486.2	436.3	120	30
次乌头原碱	470.3	438.3	110	30
乌头碱	646.3	586.3	105	45
新乌头碱	632.2	572.3	100	45
次乌头碱	616.3	556.3	115	40
苯甲酰乌头原碱	604.3	105.0	95	50
苯甲酰新乌头原碱	590.3	105.0	160	45
苯甲酰次乌头原碱	574.3	542.3	115	40

对照品溶液, 置于 4 °C 冰箱存储备用。

**2.4 给药方案与血浆样品处理** 采用随机数字法表抽取 18 只大鼠, 分为大蜜丸组 (DMW), 水蜜丸组 (SMW) 和空白组 (KB), 每组 6 只。采用单次给药法, 参考人等效用量的 8 倍生药剂量作为给药剂量 (大蜜丸和水蜜丸分别为 19.44, 19.22 g · kg<sup>-1</sup>)。灌胃给药, 空白组给予同等体积 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 溶液。给药前 12 h 禁食, 自由饮水。给药后全程禁食, 3 h 内禁水。分别于灌胃后 0.08, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 眼眶静脉丛采血约 0.5 mL, 置于含肝素的抗凝管中, 离心 (4 °C, 12 000 r · min<sup>-1</sup>, 10 min, 下同), 分离血浆, 于 -20 °C 冰箱中冻存储备用。精密吸取大鼠给药血浆 200 μL, 置于 1.5 mL 离心管中, 加入甲醇 600 μL, 涡旋震荡 60 s, 离心, 吸取全部上清液, 置于另一 1.5 mL 离心管中, 氮气流吹干, 精密加入甲醇 200 μL, 超声 1 min 使溶解, 涡旋震荡 30 s 后, 离心, 取上层清液进样分析。

**2.5 方法专属性** 分别取空白血浆、空白血浆 + 混合对照品溶液、灌胃给药后的大鼠血浆样品适量, 按 2.4 项下方法处理, 按 2.2 项下条件测定, 见图 1。结果发现大鼠血浆样品没有检测到苯甲酰乌头原碱, 检测到的其余 8 个成分的色谱峰形良好, 说明血浆中无明显杂质或代谢产物干扰, 表明该方法具有较高的专属性。

**2.6 标准曲线和定量限 (LOQ)** 取混合对照品溶液适量, 加甲醇稀释, 得系列混合对照品溶液。精密吸取大鼠空白血浆 200 μL, 分别精密加入不同质量浓度的系列混合对照品溶液, 混匀, 按 2.4 项下方法处理, 按 2.2 项下条件测定。以待测物质量浓度为



A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 对照品; C. 给药 30 min 后的血浆样品;  
1. 乌头碱; 2. 新乌头碱; 3. 次乌头碱; 4. 苯甲酰乌头原碱; 5. 苯甲酰  
新乌头原碱; 6. 苯甲酰次乌头原碱; 7. 乌头原碱; 8. 新乌头原碱;  
9. 次乌头原碱

图1 附子理中丸中9个成分的MRM色谱

Fig. 1 Representative MRM chromatograms of nine analytes in Fuzi Lizhongwan

横坐标,待测物峰面积为纵坐标,进行线性回归,所有标准曲线血浆样品均在分析前现用现配。结果见表2。

**2.7 精密度和准确度** 取大鼠空白血浆配制低、中、高3个质量浓度的质控(QC)样品( $n=5$ ),按2.4项下方法处理,考察日内和日间的变异情况,按

2.2项下条件连续测定3d,计算精密度的RSD 2.3%~11.5%,准确度的相对回收率86.7%~107.4%,符合生物样品的检测要求。

**2.8 提取回收率试验和基质效应** 取2.7项下的QC样品,按2.4项下方法处理,按2.2项下条件测定,得峰面积A;另取大鼠空白血浆,按2.4项下方法处理,经蛋白沉淀处理后加入上述相应质量浓度的混合对照品溶液,按2.2项下条件测定,得峰面积B;取上述相应质量的混合对照品溶液,按2.4项下“氮气流吹干”后方法操作,按2.2项下条件测定,得峰面积C。A与B的比值即为提取回收率,B与C的比值为基质效应。结果提取回收率79.7%~109.0%,基质效应范围在80.1%~106.5%。

**2.9 稳定性试验** 取2.7项下QC样品,按2.4项下方法操作,考察不同储存条件下样品的稳定性[室温放置6h,血浆样品冷冻放置2周,冷冻-溶解3个循环(-20℃下冷冻24h后室温下溶解并放置1h)]。结果显示血浆中8个成分(苯甲酰乌头原碱除外)在上述3种不同储藏条件下均稳定,RSD均<15.0%。

**2.10 药物动力学研究** 采用DAS 3.0药动学数据处理软件非房室模型对血药浓度-时间数据进行处理,计算药动学参数。血药浓度-时间曲线见图2,药动学参数见表3~5。结果表明除苯甲酰乌头原碱外,其余成分均可在大鼠血浆中检测到。

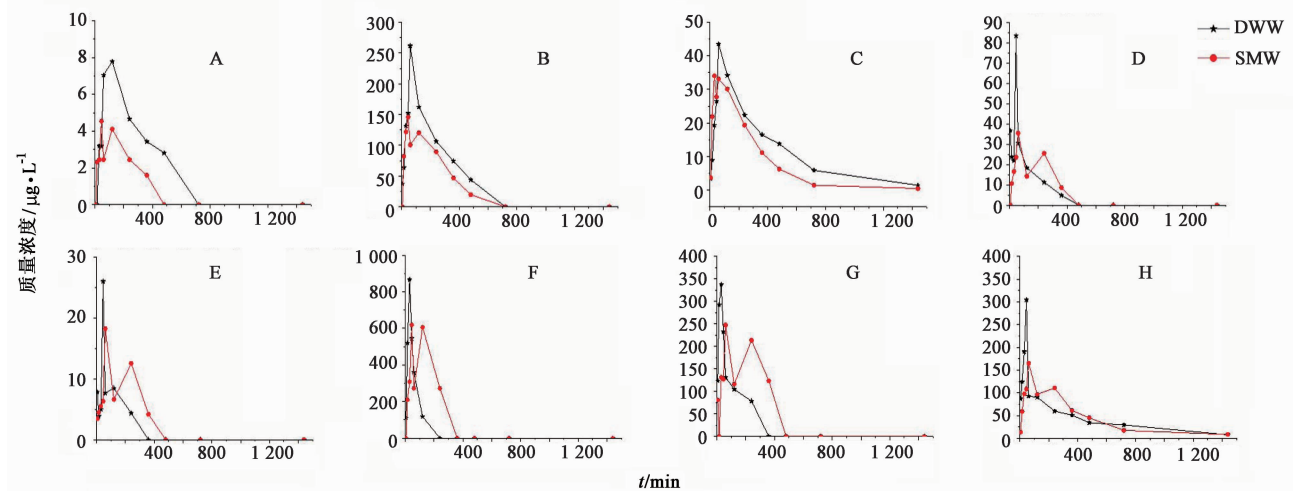
### 3 讨论

**3.1 RRLC-TQ-MS的条件优化** 前期对附子理中丸中6种生物碱类成分含量测定结果显示,各生物碱成分含量很低<sup>[15]</sup>,而入血后含量将更低,较难检测,需要具有高灵敏度、强选择性和快速的分析方法,因此采用RRLC-TQ-MS技术的MRM进行定量分析。实验对比了2种流动相系统——甲醇-水和乙腈-水,还考察了在流动相中添加体积分数为0.05%,0.1%,0.2%的甲酸和乙酸的情况,结果发现乙腈系统具有较低的噪音,且比甲醇显现出更好的峰形,而加入到流动相中的甲酸质量分数为0.1%的时候,能通过增强分析物的电离而显著提高灵敏度和优化峰形。因此选择0.1%甲酸乙腈溶液和0.1%甲酸水溶液作为流动相。在质谱条件的优化中,发现9种成分在正离子模式下都表现出更好的响应。对所有目标分析物的MRM优化为首先对对照品溶液分别采用全扫描和子离子模式,确定成分的母离子和子离子,在此基础上,将母离子和子离子的碎裂电压和碰撞能优化到最丰富的离子丰度。

表 2 9 种生物碱类成分的标准曲线、线性范围和最低定量限

Table 2 Regression equations, linear ranges and LOQs of 9 different alkaloids

化合物	标准曲线	<i>r</i>	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	LOQ/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
乌头原碱	$Y = 12\ 952X - 17.146$	0.998 7	68 ~ 1 360	0.175
新乌头原碱	$Y = 924.27X - 7.700$	0.999 0	48 ~ 960	0.355
次乌头原碱	$Y = 62\ 941X - 740.610$	0.999 7	66.5 ~ 1 330	0.018
乌头碱	$Y = 98\ 964X - 0.710$	0.998 7	1.42 ~ 28.4	0.093
新乌头碱	$Y = 79\ 922X - 37.574$	0.998 0	26 ~ 520	0.021
次乌头碱	$Y = 146\ 648X - 66.551$	0.997 6	3.3 ~ 66	0.320
苯甲酰乌头原碱	$Y = 37\ 979X - 7.573$	0.999 2	0.624 ~ 12.48	0.050
苯甲酰新乌头原碱	$Y = 32\ 167X - 58.955$	0.998 8	11 ~ 220	0.068
苯甲酰次乌头原碱	$Y = 158\ 859X - 39.795$	0.998 8	2.7 ~ 54	0.018



A. 乌头碱; B. 新乌头碱; C. 次乌头碱; D. 苯甲酰新乌头原碱; E. 苯甲酰次乌头原碱; F. 乌头原碱; G. 新乌头原碱; H. 次乌头原碱

图 2 大鼠灌胃大蜜丸和水蜜丸后 8 个成分的药-时曲线

Fig. 2 Mean plasma concentration-time profiles of eight analytes after oral administration of big honeyed pill (DMW) and water-honeyed pill (SMW)

表 3 双酯型生物碱类成分的药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Pharmacokinetic parameters of diester alkaloids after oral administration of DMW and SMW ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

参数/单位	乌头碱		新乌头碱		次乌头碱	
	DMW	SMW	DMW	SMW	DMW	SMW
$AUC_{0-t}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$	2 225 ± 490.4	991.3 ± 182.2 <sup>1)</sup>	54 100 ± 9 157	37 368 ± 8 258 <sup>1)</sup>	15 979 ± 2 812	10 798 ± 1 604 <sup>1)</sup>
$AUC_{0-\infty}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$	3 356 ± 629.7	1 459.8 ± 396.5 <sup>1)</sup>	66 548 ± 6 903	40 992 ± 8 773 <sup>1)</sup>	16 469 ± 2 921	10 818 ± 1 621 <sup>1)</sup>
$t_{1/2}/\text{min}$	291.3 ± 34.88	191.3 ± 39.22 <sup>1)</sup>	199.5 ± 54.02	118 ± 19.22 <sup>1)</sup>	278.1 ± 47.03	138 ± 32.18 <sup>1)</sup>
$T_{\text{max}}/\text{min}$	110 ± 24.5	45 ± 0 <sup>1)</sup>	60 ± 0	42.5 ± 6.124 <sup>1)</sup>	60.00 ± 0	45 ± 16.43 <sup>2)</sup>
$CL_z/F/L\cdot\text{min}^{-1}$	1 784 ± 295	4 182 ± 1 025 <sup>1)</sup>	88.48 ± 9.396	146.6 ± 33.34 <sup>1)</sup>	363.1 ± 60.09	543.3 ± 80 <sup>1)</sup>
$C_{\text{max}}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	8.46 ± 3.443	4.537 ± 0.86 <sup>2)</sup>	261.7 ± 49.76	159.1 ± 30.93 <sup>1)</sup>	43.53 ± 5.860	35.19 ± 6.782 <sup>2)</sup>

注:与 DMW 组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ (表 4,5 同)。

**3.2 样品处理方法考察** 血浆中含有的大量内源性物质,这会降低待测成分的血药浓度,干扰待测成分的检测,需要对其进行处理。目前,血浆样品常用的处理方法有固相萃取法、有机溶剂萃取法和有机

溶剂沉淀法<sup>[16]</sup>。有机溶剂萃取法通常用于单一成分的药代动力学研究,采用甲醇沉淀法和固相萃取法处理血浆样品,回收率均较高,但固相萃取法处理步骤相对繁琐,甲醇沉淀法成本较低且操作简便,故

表 4 单酯型生物碱类成分的药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Pharmacokinetic parameters of monoester alkaloids after oral administration of DMW and SMW ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

参数/单位	苯甲酰新乌头原碱		苯甲酰次乌头原碱	
	DMW	SMW	DMW	SMW
$AUC_{0-t} / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$	6 606 ± 710. 9	6 954 ± 730	1 881 ± 239. 3	3 292 ± 1 068 <sup>1)</sup>
$AUC_{0-\infty} / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$	7 361 ± 628. 4	9 442 ± 1 115 <sup>1)</sup>	2 331 ± 347. 7	6 008 ± 1 530. 5 <sup>1)</sup>
$t_{1/2} / \text{min}$	107. 7 ± 26. 4	198. 2 ± 16. 24 <sup>1)</sup>	78. 77 ± 5. 704	282. 5 ± 60. 72 <sup>1)</sup>
$T_{\text{max}} / \text{min}$	45 ± 0	60 ± 0	45 ± 0	60 ± 0
$CL_z / F / \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$	797. 5 ± 69. 9	617. 4 ± 65. 11 <sup>1)</sup>	2 555 ± 424. 6	1 015 ± 262. 9 <sup>1)</sup>
$C_{\text{max}} / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	83. 38 ± 16. 06	35. 43 ± 2. 295 <sup>1)</sup>	25. 96 ± 4. 263	18. 23 ± 6. 686 <sup>2)</sup>

表 5 醇胺型生物碱类成分的药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 5 Pharmacokinetic parameters of alcohol amine alkaloids after oral administration of DMW and SMW ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

参数/单位	乌头原碱		新乌头原碱		次乌头原碱	
	DMW	SMW	DMW	SMW	DMW	SMW
$AUC_{0-t} / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$	43 336 ± 6 534	98 536 ± 10 966 <sup>1)</sup>	32 542 ± 7 196	58 449 ± 11 559 <sup>1)</sup>	57 883 ± 5 782	59 287 ± 7 245
$AUC_{0-\infty} / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$	50 535 ± 7 745	235 608 ± 35 153 <sup>1)</sup>	43 321 ± 16 016	133 220 ± 33 228 <sup>1)</sup>	62 568 ± 8 487	64 203 ± 8 394
$t_{1/2} / \text{min}$	33. 86 ± 9. 696	268. 6 ± 171 <sup>1)</sup>	100. 8 ± 49. 04	346. 6 ± 132. 3 <sup>1)</sup>	394. 7 ± 89. 48	395. 5 ± 66. 28
$T_{\text{max}} / \text{min}$	32. 5 ± 6. 124	95 ± 38. 73 <sup>1)</sup>	27. 5 ± 11. 29	60 ± 0 <sup>1)</sup>	45 ± 0	60 ± 0
$CL_z / F / \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$	117. 7 ± 17. 64	24. 96 ± 3. 883 <sup>1)</sup>	149. 3 ± 49. 59	45. 85 ± 12. 61 <sup>1)</sup>	94. 75 ± 13. 35	91. 21 ± 12. 47
$C_{\text{max}} / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	879. 2 ± 109. 4	643. 9 ± 60. 66 <sup>1)</sup>	356. 2 ± 26. 3	247. 5 ± 47. 19 <sup>1)</sup>	304. 9 ± 45. 62	165. 2 ± 5. 56 <sup>1)</sup>

选择了甲醇沉淀法。

**3.3 药动学分析** 文献报道双酯型生物碱性性质不稳定,在体内可以转化为单酯型生物碱及醇胺型生物碱<sup>[17]</sup>。由表 3 可知,大蜜丸中 3 种双酯型生物碱的达峰时间 ( $T_{\text{max}}$ ) 和半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 均比水蜜丸延长,说明大蜜丸中双酯型生物碱在动物体内转化为单酯型生物碱和醇胺型生物碱的速度比水蜜丸缓慢。因此,从双酯型生物碱药动学参数的角度提示,炼蜜的加入起到延缓附子理中丸中成分吸收的作用。但同时也注意到,大蜜丸组 3 种双酯型生物碱的药-时曲线下面积 ( $AUC_{0-\infty}$ ) 和药峰浓度 ( $C_{\text{max}}$ ) 均大于水蜜丸组,而清除率 (CL) 却小于水蜜丸。文献报道外排转运蛋白在药物的吸收和分布过程中起着非常重要的作用<sup>[18]</sup>,位于内皮细胞或上皮细胞黏膜侧的主要有 P-糖蛋白 (P-gp),乳腺癌耐药蛋白 (BCRP) 和多药耐药蛋白 2 (MRP2),这些蛋白能将细胞内的药物外排至肠腔中,降低药物的生物利用度,双酯型生物碱的吸收转运受到 P-gp 的介导,同时也可能受到 BCRP 和 MRP2 的影响<sup>[19]</sup>。而蜂蜜中含有黄酮类成分<sup>[20]</sup>,其中的染料木素是 BCRP 的天然底物,可竞争性抑制 BCRP 的介导作用<sup>[21]</sup>,槲皮素和芦丁可抑制 P-gp 的转运功能<sup>[22]</sup>。因此,推测大蜜丸中双酯型生物碱  $AUC_{0-t}$  明显高于水蜜丸的原因可能是蜂蜜中的黄酮类成分通过抑制 BCRP 和 P-gp 的外排转

运功能造成的,当然这还需要进一步研究证实。

由表 4 可知,大蜜丸组的苯甲酰新乌头原碱和苯甲酰次乌头原碱的  $C_{\text{max}}$  明显增加,  $T_{\text{max}}$  有所降低,表明大蜜丸中 2 种单酯型生物碱的吸收速度较快;大蜜丸组  $t_{1/2}$  明显缩短 ( $P < 0.01$ ),显示大蜜丸中这 2 种单酯型生物碱的代谢速度较快。同时,大蜜丸和水蜜丸的苯甲酰次乌头原碱  $C_{\text{max}}$  均小于苯甲酰新乌头原碱的  $C_{\text{max}}$ ,质量浓度顺序同先前文献报道一致<sup>[14]</sup>。2 种剂型均未检测到苯甲酰乌头原碱。有研究报道,复方中的附子单酯型生物碱的  $C_{\text{max}}$  比附子单味药的  $C_{\text{max}}$  明显下降<sup>[13]</sup>,甚至检测不到<sup>[14]</sup>。因此推测未检测到苯甲酰乌头原碱的原因可能是由于附子理中丸中与附子共存的其他药味影响引起的。

由表 5 可知,大蜜丸组 3 种醇胺型生物碱的  $AUC_{0-\infty}$  均小于水蜜丸组,而  $C_{\text{max}}$  却大于水蜜丸,且  $T_{\text{max}}$  和  $t_{1/2}$  均少于水蜜丸,CL 大于水蜜丸,说明大蜜丸中醇胺型生物碱在体内的吸收和代谢速度均快于水蜜丸。肝脏存在大量的细胞色素 P450 氧化酶 (CYP450 酶),而 CYP450 酶对这些生物碱的代谢影响排序为双酯型生物碱 > 单酯型生物碱 > 醇胺型生物碱<sup>[19]</sup>,因此,推测大蜜丸和水蜜丸所含的生物碱在入血后,通过门静脉进入肝脏,双酯型生物碱被逐渐代谢成单酯型和醇胺型生物碱,血液中单酯型和

醇胺型生物碱吸收量增加。但由于大蜜丸双酯型生物碱吸收量较大,当达到肝饱和后双酯型生物碱吸收量仍在不断增加。因此,本文结果显示大蜜丸中单酯型生物碱和醇胺型生物碱的吸收和代谢速度均快于水蜜丸。

本研究结果显示,辅料炼蜜能够引起附子理中丸中制附子的双酯型生物碱在体内达到药峰时间延长,消除速度减慢。而双酯型生物碱又可转化为单酯型生物碱和醇胺型生物碱,提示炼蜜在该复方中能够起到延缓生物碱类成分吸收的作用。此外,本文结果显示,炼蜜可以增加双酯型生物碱的吸收,并且延迟其排泄,其为附子中毒性最强的一类生物碱。传统认为大蜜丸适合长期服用,那么,长期服用附子理中大蜜丸,或者其他含有有毒成分的传统蜜丸剂型,是否会引起临床毒副作用的增加,还需要深入的实验研究和临床监控来证实,以避免不良反应的发生。

#### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:191-193.

[2] 张庆辉. 附子理中丸中毒致心律失常1例[J]. 临床荟萃,2010,25(23):2082.

[3] 陈玉秋. 附子理中丸中毒致严重休克心律失常1例[J]. 吉林医学信息,2002,19(7):42.

[4] 王建凯,刘国良. 附子理中丸致中毒反应2例报道[J]. 实用中医药杂志,2001,17(1):43.

[5] 陈荣昌,孙桂波,张强,等. 附子炮制减毒的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(15):237-241.

[6] 曲帅,阚鸿,何忠梅,等. 乌头类中药炮制配伍减毒增效研究进展[J]. 农业与技术,2015,35(23):14-18.

[7] 解素花,张广平,孙桂波,等. 附子与甘草不同配伍比例配伍减毒的实验研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(15):2210-2214.

[8] 奚丽君,陈卫平. 附子与干姜配伍增效减毒作用机制研究概述[J]. 实用中医药杂志,2008,4(9):608-610.

[9] 刘海军,黄涛,刘可越. 中药蜜炙辅料炼蜜的研究进展及分析[J]. 黑龙江畜牧兽医,2015(23):68-70.

[10] 孙严彤. 生物医学工程专业《体内药物分析》的教学体会[J]. 检验医学与临床,2014,11(17):2482-2483.

[11] YU B, CAO Y, XIONG Y K. Pharmacokinetics of aconitine-type alkaloids after oral administration of Fuzi (Aconiti Lateralis Radix Praeparata) in rats with chronic heart failure by microdialysis and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 165: 173-179.

[12] LIU X, LI H, XING J W, et al. Simultaneous

quantification of chrysophanol and physcion in rat plasma by ultra fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry and application of the technique to comparative pharmacokinetic studies of Radix et Rhei Rhizoma extract alone and Dahuang Fuzi decoction[J]. J Chromatogr B,2015,980:88-93.

[13] LIU X, LI H, SONG X Q, et al. Comparative pharmacokinetics studies of benzoylhypaconine, benzoylmesaconine, benzoylaconine and hypaconitine in rats by LC-MS method after administration of Radix Aconiti Lateralis Praeparata extract and Dahuang Fuzi Decoction [J]. Biomed Chromatogr, 2014, 28 (7): 966-973.

[14] ZHANG Q, MA Y M, WANG Z T, et al. Pharmacokinetics difference of multiple active constituents from decoction and maceration of Fuzi Xiexin Tang after oral administration in rat by UPLC-MS/MS[J]. J Pharm Biomed Anal,2014,92:35-46.

[15] 宋志前,甘嘉荷,董运茁,等. 附子理中丸中制附子的6种生物碱成分含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(10):55-60.

[16] 蔡品品. 基于GC-MS的样品前处理及血清/血浆对比研究[D]. 长沙:中南大学,2013.

[17] YE L, GAO S, FENG Q, et al. Development and validation of a highly sensitive UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of aconitine, mesaconitine, hypaconitine, and five of their metabolites in rat blood and its application to a pharmacokinetics study of aconitine, mesaconitine, and hypaconitine [J]. Xenobiotica,2012,42(6):518-525.

[18] Marquez B, Van Bambeke F. ABC multidrug transporters: target for modulation of drug pharmacokinetics and drug-drug interactions [J]. Curr Drug Targets,2011,12(5):600-620.

[19] 杨晓珊. CYP450酶与BCRP、MRP2外排转运蛋白对单酯型和醇胺型乌头生物碱处置的作用及机制[D]. 广州:南方医科大学,2014.

[20] 王笑笑,周勇,俞婷婷,等. UPLC-MS/MS法分析10种不同蜜源蜂蜜中的黄酮类组分[J]. 药物分析杂志,2016,36(12):2180-2189.

[21] ZHU W, XU H Y, Stephen W J W, et al. Breast cancer resistance protein (BCRP) and sulfotransferases contribute significantly to the disposition of genistein in mouse intestine[J]. AAPS J,2010,12(4):525-536.

[22] Mohana S, Ganesan M, Agilan B, et al. Screening dietary flavonoids for the reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in cancer[J]. Mol Biosyst,2016,12(8):2247-2458.

[责任编辑 刘德文]