

• 药物代谢 •

附子中 3 种双酯型生物碱在体外血浆中的水解规律研究

王 瑞¹, 展晓日², 乔延江^{3*}

(1. 山西中医学院中药系, 山西 太原 030024; 2. 杭州师范大学生物医药与健康中心, 浙江 杭州 310012;
3. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 建立体外血浆温孵法测定乌头碱、中乌头碱和次乌头碱水解规律的方法。方法: 空白兔血浆加入不同浓度的 3 种生物碱混合对照品溶液, 通过对温孵不同时间血浆样品的预处理(沉淀蛋白、除杂)、分离和检测等过程实现复杂生物样品中待测成分的分离分析。结果: 乌头碱、中乌头碱和次乌头碱浓度在血浆中均随温孵时间的延长逐渐降低, 水解速率中乌头碱 > 乌头碱 > 次乌头碱, 与附子饮片在炮制过程中 3 种双酯型生物碱的水解规律一致。结论: 所建立的体外水解方法简单、稳定、可控, 对上述 3 种成分的体内药动学研究具有一定的参考意义。

[关键词] 附子; 乌头碱; 体外实验

[中图分类号] R969.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)06-0029-04

Study on in vitro Hydrolysis in Rabbit Plasma of Three Diester-type Alkaloids from Radix Aconiti Lateralis

WANG Rui, ZHAN Xiao-ri, QIAO Yan-jiang*

(1. Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China;

2. Center of Biomedicine and Health, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310012, China;

3. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a platform of incubation of plasma in vitro for analysis of components of traditional Chinese medicine. **Methods:** The aconitic alkaloids were as one of the examples. Aconitine, mesaconitine and hyaconitine were added to rabbit plasma and incubated for various durations. The plasma samples were processed with acetonitrile to denature and deposit the protein and extracted the three alkaloids, and the acetonitrile solution was analyzed by a RP chromatographic system. **Results:** The concentration of aconitine, mesaconitine and hyaconitine in plasma was decreased with the prolonged incubation time, the hydrolysis rate of mesaconitine was the fastest, aconitine was the second and hyaconitine was the third. **Conclusion:** A simple, stable and controllable method has been established, which has some reference value for pharmacokinetic study of aconitic alkaloids.

[Key words] Radix Aconiti lateralis; aconitic alkaloids; in vitro experiment

[收稿日期] 2008-11-11

[基金项目] 中医药疗效及安全性基本问题研究项目
(2004BA721A11)

[通讯作者] * 乔延江, Tel: (010) 84738601; E-mail: yjqiao@263.net

离体实验有很多优越性, 例如可以严格控制实验条件, 对比性、重复性、稳定性较好, 实验过程短, 大大简化了分析过程, 用药量少, 节省了试剂和动物饲养开支等。且所得结果较易分析^[1-2]。本章采用血浆温孵法对乌头碱、中乌头碱和次乌头碱的体外水解动力学过程进行了研究, 探讨 3 种双酯型生物

碱体外水解的一般规律。

1 材料

1.1 药品与试剂 乌头碱(批号: 0720-9807)、中乌头碱(批号: 0799-9403)和次乌头碱对照品(批号: 0798-9403)(纯度均大于 98%)购自中国药品生物制品检定所。乙腈、甲醇为色谱纯,购自 Sigma aldrich 公司。三氯乙酸和氨水为分析纯,购自北京北化精细化学品有限责任公司。醋酸铵为分析纯,购自北京化学试剂公司。

1.2 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),包括:四元泵、真空脱气泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器、HP 数据处理工作站。LDZ4-0.8 型低速自动平衡微型离心机(北京医用离心机厂)。Oasis MCX 固相萃取柱(1 cc/30 mg, 美国 Waters 公司)。SHZ-A 水浴恒温振荡器(上海跃进医疗器械厂)。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱: Hepsil BDS C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), RP-18 保护柱; 流动相: 40 mmol·L⁻¹ 醋酸铵(氨水调 pH 10)(A)-乙腈(B) 梯度洗脱, 分析时间 50 min, 0~45 min A: B 从 85%: 15% → 40%: 60%, 45~50 min 保持在 40% A; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 240 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。

2.2 血浆的制备 新西兰兔(雄性, 2 只, 体重约 2 kg), 购自北京维通利华动物技术有限公司, 许可证编号: SCXK(京)2004-0005, 禁食 12 h (不禁饮), 一只耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠(0.7 mL·kg⁻¹) 麻醉, 另一只乙醚麻醉, 颈动脉采血于盛有肝素钠(30 mg)的磨口三角瓶中, 采血过程中轻轻振摇三角瓶, 使肝素钠均匀溶于血中。收集全血, 4 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 移取上清液, 即得血浆, 装于 2 个具塞三角瓶中, 备用。

2.3 乌头碱、中乌头碱和次乌头碱混合对照品溶液的配制 取乌头碱、中乌头碱和次乌头碱适量, 精密称定, 加 DMSO 溶解制得含乌头碱 6.58 mg·mL⁻¹, 中乌头碱 9.12 mg·mL⁻¹ 和次乌头碱 8.68 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液 ①。移取 ① 适量, 分别稀释为: ②含乌头碱 3.948 mg·mL⁻¹, 中乌头碱 5.472 mg·mL⁻¹ 和次乌头碱 5.208 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液; ③含乌头碱 2.368 8 mg·mL⁻¹, 中乌头碱 3.283 2 mg·mL⁻¹ 和次乌头碱 3.124 8 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。以上 3 个浓度的溶液作为血浆温孵法的储备液。

2.4 血浆孵育法 移取“2.3”项下对照品 ① ② ③ 各 3 份, 每份 50 μL, 分别置于预先通 95% O₂ + 5% CO₂ 混合气体的 37 °C, 4 950 μL 血浆溶液中, 水浴恒温振荡器中温孵。水浴温度维持在(37 ± 0.5) °C, 转速 60 r·min⁻¹, 并不断充以 95% O₂ + 5% CO₂ 气体。

2.5 方法学考察 进行血浆样品预处理方法、线性化范围、精密度、稳定性、检测限、重复性和回收率试验。

2.6 血浆样品测定 血浆温孵 0, 5, 10, 15, 30, 45 min, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 10 h 后分别取样 300 μL(取样后随即加入等体积的空白血浆, 以保持温孵血浆总体积不变), 按照优选的样品预处理方法处理血浆样品, 在上述色谱条件下进行测定。

3 结果

3.1 方法学考察结果

3.1.1 含药血浆预处理方法学考察结果 比较蛋白沉淀法(以甲醇、乙腈、10% 三氯乙酸的乙腈溶液为沉淀剂, 与血浆的体积比分别为 2: 1, 1: 1, 1: 1)和固相萃取法(Oasis MCX 1 cc/30 mg 固相萃取柱)对血浆中乌头碱、中乌头碱和次乌头碱的提取率。结果表明, 乙腈对 3 种生物碱的萃取率最好, 均大于 90%, 且溶剂用量较小。

3.1.2 线性关系考察 分别称取对照品乌头碱、中乌头碱和次乌头碱适量, 精密称定, 以 0.05% 盐酸-甲醇溶液溶解制得含乌头碱 3 210 μg·mL⁻¹, 中乌头碱 3 060 μg·mL⁻¹ 和次乌头碱 3 070 μg·mL⁻¹ 的对照品储备液。取上述混合对照品储备液 0.5 mL, 置于 5 mL 容量瓶中, 加入兔血浆定容至刻度, 摇匀, 即得含乌头碱 321 μg·mL⁻¹, 中乌头碱 306 μg·mL⁻¹ 和次乌头碱 307 μg·mL⁻¹ 的混合对照品血浆溶液。分别移取上述对照品的血浆溶液 10, 50, 100, 200, 400, 800, 1 000 μL 置 1 mL 量瓶中, 加兔血浆至刻度, 摇匀。移取上述各溶液 0.5 mL 置于 2 mL ep 管中, 加 0.5 mL 乙腈, 摇匀, 4 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清液, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 分别进样 10 μL, 按上述色谱条件进行 HPLC 分析。以峰面积 Y 对进样量 X (μg) 进行回归处理, 得到乌头碱、中乌头碱和次乌头碱的回归方程分别为:

$$Y = -0.678 + 8.622 \times 10^2 X \quad r = 0.9999$$

$$Y = 2.169 + 8.627 \times 10^2 X \quad r = 0.9998$$

$$Y = 3.901 + 8.891 \times 10^2 X \quad r = 0.9996$$

3 者的线性范围分别为 0.016 05 ~ 1.605 μg,

0.015 3~ 1.53 μg 和 0.015 35~ 1.535 μg 。

3.1.3 精密度试验 精密量取对照品储备液 50 μL , 置于 10 mL 容量瓶中, 加入兔血浆定容至刻度, 摇匀, 再取上述对照品的血浆溶液 0.5 mL 置于 2 mL 管中, 加 0.5 mL 乙腈, 摇匀, 4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取上清液按上述色谱条件进行 HPLC 分析, 连续进样 6 次, 每次进样 10 μL 。乌头碱、中乌头碱和次乌头碱峰面积的 RSD 值分别为 1.1%, 1.6% 和 1.2%, 表明仪器精密度良好。

3.1.4 稳定性试验 按“3.1.3”项下方法配制混合对照品溶液, 放置 0, 3, 6, 9, 12 h 后, 按上述色谱条件进行 HPLC 分析, 每次进样 10 μL , 乌头碱、中乌头碱和次乌头碱峰面积的 RSD 值分别为 2.0%, 1.0% 和 0.6%, 表明 3 种生物碱在乙腈中 12 h 内稳定。

3.1.5 检测限 精密量取对照品储备液 50 μL , 置于 10 mL 容量瓶中, 加入兔血浆定容至刻度, 摇匀, 再取上述对照品的血浆溶液定量以免血浆稀释, 分别取 0.5 mL 置于 2 mL ep 管中, 加 0.5 mL 乙腈, 摇匀, 4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取上清液按上述色谱条件进行 HPLC 分析, 进样并记录色谱图, 在 $S/N > 3$ 时, 乌头碱、中乌头碱和次乌头碱的检测限分别为 3.80, 3.53 和 3.88 ng。

3.1.6 重复性试验 精密量取对照品储备液 50 μL , 置于 10 mL 容量瓶中, 加入兔血浆定容至刻度, 摇匀, 再取上述对照品的血浆溶液 0.5 mL 共 6 份, 置于 2 mL ep 管中, 加 0.5 mL 乙腈, 摇匀, 4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取上清液按上述色谱条件进行 HPLC 分析, 每次进样 10 μL 。样品中的乌头碱、中乌头碱和次乌头碱含量的 RSD 值分别为 1.5%, 0.7% 和 1.3%, 方法的重复性较好。

3.1.7 回收率试验 取 10 mL 量瓶 9 个, 每 3 个精密加入对照品储备液以免血浆稀释 20 倍后的溶液 1, 2, 5 mL, 再加入空白兔血浆定容至刻度, 摇匀, 按“1.1 含药血浆预处理方法学考察结果”项下方法制备样品溶液, 按上述色谱条件分别进样 10 μL ; 同时精密移取对照品储备液以 0.05% 盐酸-甲醇溶液稀释 20 倍后的溶液 1, 2, 5 mL 分别置 3 个 10 mL 容量瓶中, 加 0.05% 盐酸-甲醇溶液至刻度, 摇匀, 按上述色谱条件分别进样 5 μL 作为随行对照。乌头碱、中乌头碱和次乌头碱的回收率如表 1 所示。

3.2 血浆样品测定结果 乌头碱(AC)、中乌头碱(MA)和次乌头碱(HA)高, 中, 低浓度血浆样品温孵

后不同时间点含量见表 2, HPLC 色谱图见图 1, 水解曲线如图 2 所示。

表 1 回收率试验 ($n=3$)

对照品	浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	平均回收率(%)	RSD(%)
中乌头碱	15.3	93.90	1.8
	30.6		
	76.75		
乌头碱	16.05	93.62	1.4
	32.1		
	80.25		
次乌头碱	15.35	100.07	2.0
	30.7		
	76.75		

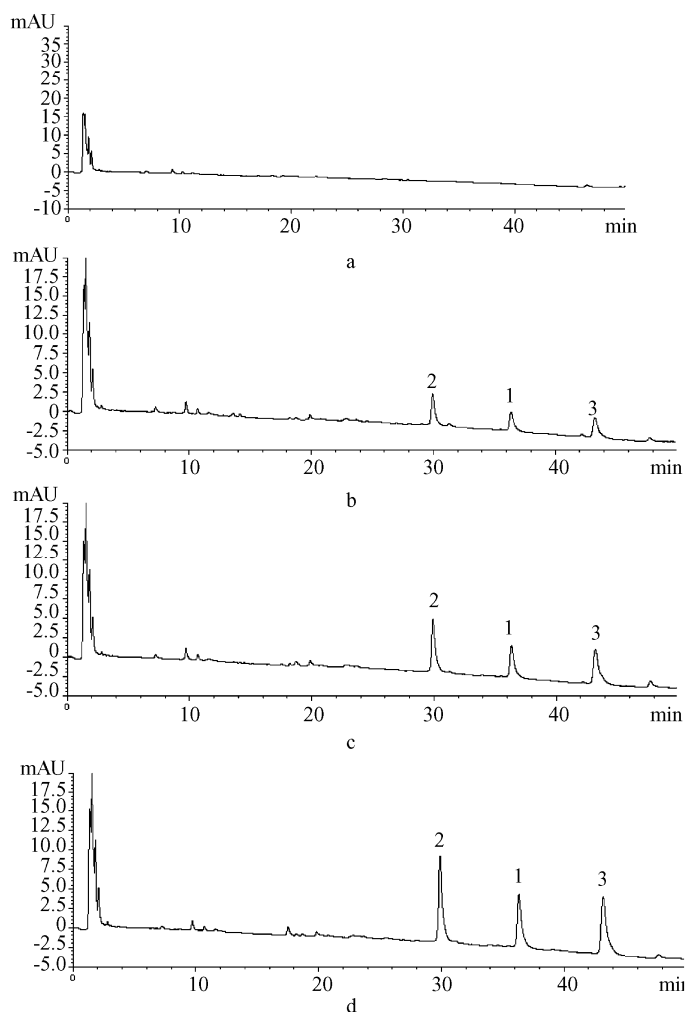


图 1 不同浓度血浆样品色谱图

a 空白血浆; b 低浓度血浆孵育 5 min; c 中浓度血浆孵育 5 min; d 高浓度血浆孵育 5 min; 1. 乌头碱; 2. 新乌头碱; 3. 次乌头碱

4 讨论

血浆样品的预处理是将待测成分从血浆中提取出来的处理过程。本文比较了蛋白沉淀法(分别以甲醇、乙腈和 10% 三氯乙酸的乙腈溶液为沉淀剂, 与血浆的体积比分别为 2: 1, 1: 1, 1: 1) 和固相萃取法(Oasis MCX 固相萃取柱)对血浆中乌头碱、中乌头碱

表 2 2 种双酯型生物碱高, 中, 低浓度血浆样品
温孵后不同时间点含量 (n = 3)

温孵 时间	低浓度样品($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			中浓度样品($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			高浓度样品($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
	AC	MA	HA	AC	MA	HA	AC	MA	HA
0 min	23.688	32.832	31.248	39.48	54.72	52.08	65.8	91.2	86.8
5 min	20.597	29.811	28.447	37.124	50.211	50.437	58.977	84.059	84.423
10 min	18.769	27.814	25.453	34.571	47.393	47.936	56.988	79.210	81.806
15 min	16.425	25.470	23.582	32.534	45.556	45.219	49.890	74.395	77.770
30 min	15.345	22.775	22.592	29.765	43.430	43.575	44.747	70.136	74.166
45 min	14.527	21.442	21.998	28.112	41.808	42.361	38.781	66.828	72.351
1 h	13.629	21.008	20.920	26.707	39.337	42.140	37.111	63.632	71.366
1.5 h	12.735	19.061	19.860	22.175	34.757	41.289	33.226	53.429	69.624
2 h	11.458	16.595	18.903	19.066	28.634	39.430	27.945	46.124	66.273
2.5 h	9.311	13.517	17.378	16.856	25.794	37.417	24.414	43.536	64.864
3 h	8.026	11.814	16.467	13.822	22.768	35.246	18.722	35.936	61.562
4 h	4.320	9.313	14.039	7.978	16.785	31.387	11.281	25.716	56.021
5 h	3.282	7.538	11.956	5.806	13.126	27.986	9.121	19.164	52.933
6 h	2.890	5.617	9.517	3.671	9.783	25.847	4.835	15.167	47.051
8 h	—	3.443	7.328	2.510	6.229	21.137	2.434	8.910	40.480
10 h	—	1.522	5.497	—	2.886	16.421	—	5.700	31.280

注: 一未检出

和次乌头碱的提取率。蛋白沉淀法的操作方法为: 在血浆中加入相应体积的有机溶剂后, 振荡混匀, $4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取上清液, $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过; 固相萃取法的操作流程为: 1 mL 甲醇活化, 1 mL 水平衡, 上样, 分别以 1 mL 2% (体积比) 甲酸水溶液、1 mL 甲醇淋洗, 5% (体积比) 氨水-甲醇洗脱。血浆中样品成分相对简单, 以上几种样品预处理方法所得空白血浆对样品测定均无干扰, 而且提取后的样品无需浓缩富集即可达到 HPLC 检测限, 因此选择了乙腈沉淀蛋白这种相对简单, 提取率也较高的样品预处理方法。

本文采用体外血浆温孵法对不同浓度的乌头碱、中乌头碱和次乌头碱混合血浆溶液的代谢过程进行了研究。3 种生物碱在血浆中均随温孵时间的增加浓度逐渐降低, 由表 2 中含量测定数据可知, 低, 中, 高 3 个浓度水解的平均速率分别为乌头碱 $2.96, 4.62, 7.92\ \text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$, 中乌头碱 $3.13, 5.18, 8.55\ \text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$, 次乌头碱 $2.58, 3.57, 5.52\ \text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ 。温孵的前 15 min, 乌头碱、中乌头碱和次乌头碱浓度急剧降低, 说明 3 种成分水解速度在前 15 min 均较快, 从温孵的第 20 min 开始, 它们的水解速度逐渐减慢, 可能是由于其毒性较大, 有细胞毒性的作用, 对酶活性有一定的抑制。

体外代谢实验可迅速地解决一些复杂药物代谢研究中的问题, 可以比较方便地控制某些代谢条件, 在中药代谢研究中具有突出的优越性。但药物成分在体内外的代谢行为未必一致, 因此需要根据体外

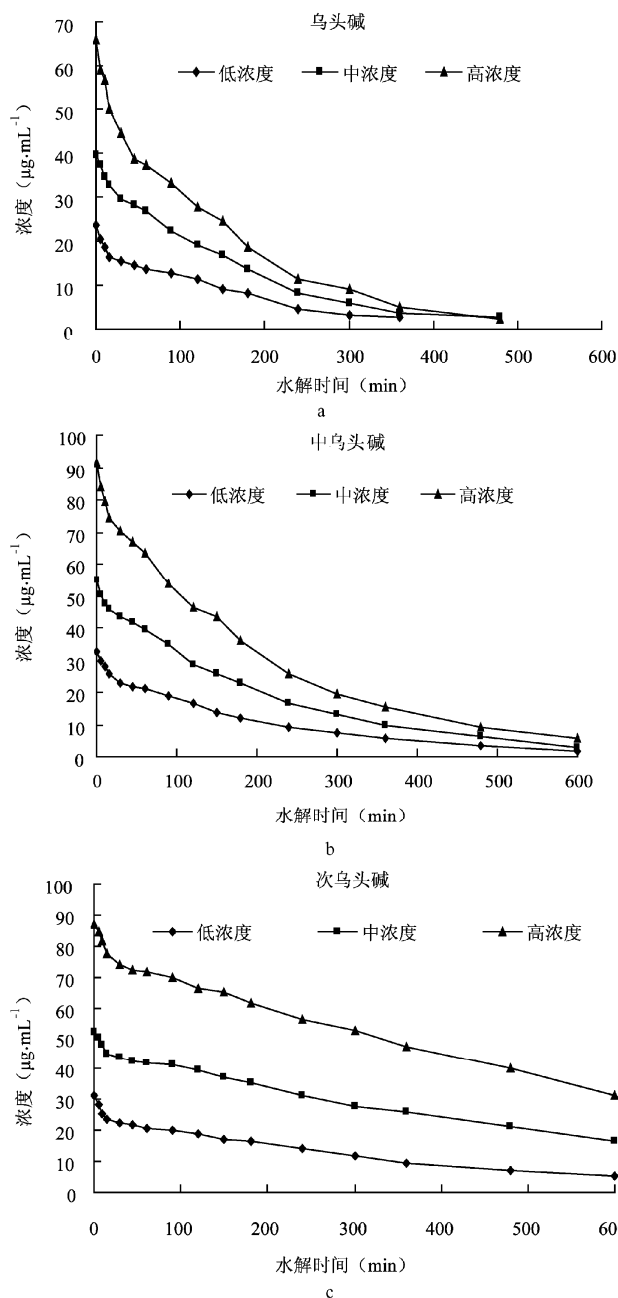


图 2 3 种双酯型生物碱血浆温孵水解曲线

a 乌头碱水解曲线; b 中乌头碱水解曲线; c 次乌头碱水解曲线
代谢得到的信息, 进一步研究其体内过程。

乌头碱、中乌头碱和次乌头碱的血浆溶液浓度随温孵时间的增加逐渐降低, 除了酶类对这 3 种成分的水解作用之外, 血浆中所含的水及其他成分对 3 种成分代谢的影响、酶类与 3 种成分代谢的关系, 主要代谢产物及其含量变化有待于进一步的研究。

[参考文献]

[1] 杨文珍, 韩 霞. 方剂药理实验方法及设计原则[J]. 山西中医学院学报, 2002, 3(2): 59.
[2] 廖 沙. 阿德福韦酯及其结构类似物的体外药代动力学性质比较研究[D]. 中国人民解放军军事医学科学院硕士学位论文, 2005: 48.