

黑顺片与大黄联用对次乌头碱在大鼠体内药动学的影响

千小红*,任常谕(成都市第五人民医院药剂科,成都 611130)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)28-3950-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.28.21

摘要 目的:研究黑顺片与大黄联用对次乌头碱在大鼠体内药动学的影响。方法:取大鼠随机分为单用(黑顺片单煎液)组和联用(黑顺片-大黄合煎液)组,每组18只,ig相应药物,给药剂量均按黑顺片计为10 g(生药)/kg。分别于给药前(0 h)和给药后0.083、0.167、0.333、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8、10 h采血0.3 ml,每个时间点取6只,采用高效液相色谱-质谱法,以盐酸巴马汀为内标,测定次乌头碱的血药浓度。利用DAS2.0.1药动学软件计算药动学参数。结果:次乌头碱检测质量浓度的线性范围为0.102 4~100 ng/ml($r=0.998\ 7$),定量限为0.1 ng/ml。其在单用组和联用组大鼠体内的药动学参数 t_{\max} 分别为(0.50±0.086)、(0.75±0.132) h, $t_{1/2}$ 分别为(9.967±1.123)、(3.708±0.507) h, $AUC_{0-10\ h}$ 分别为(26.087±0.672)、(6.516±1.135) $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$, c_{\max} 分别为(6.124±2.312)、(1.592±0.051) $\mu\text{g}/\text{L}$;与单用组比较,联用组大鼠体内次乌头碱的 $t_{1/2}$ 、 $AUC_{0-10\ h}$ 、 c_{\max} 均减小,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:大黄可以抑制次乌头碱在大鼠体内的吸收,加快其在体内的消除。

关键词 高效液相色谱-质谱法;次乌头碱;黑顺片;大黄;药动学

Effects of Heishun Tablets Combined with *Rheum palmatum* on the Pharmacokinetics of Hypaconitine in Rats

GAN Xiao-hong, REN Chang-yu (Dept. of Pharmacy, Chengdu Fifth People's Hospital, Chengdu 611130, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of Heishun tablets combined with *Rheum palmatum* on the pharmacokinetics of hypaconitine in rats. METHODS: Rats were randomly divided into single drug group (Heishun tablets decoction) and drug combination group (Heishun tablets-*R. palmatum* mixture decoction), with 18 rats in each group. They were given relevant drugs intragastrically, by 10 g (medicinal materials)/kg of Heishun tablets. 0.3 ml blood samples were collected before (0 h) and 0.083, 0.167, 0.333, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10 h after medication with 6 rats at each time point, respectively. The blood concentration of hypaconitine was determined by HPLC-MS using palmartine hydrochloride as internal standard. DAS 2.0.1 software was used to calculate pharmacokinetic parameters. RESULTS: The linear range of hypaconitine was 0.102 4-100 ng/ml ($r=0.998\ 7$), and the limit of quantification was 0.1 ng/ml. The pharmacokinetic parameters of single drug group vs. drug combination group were as follows as t_{\max} of (0.50±0.086) h vs. (0.75±0.132) h; $t_{1/2}$ of (9.967±1.123) h vs. (3.708±0.507) h; $AUC_{0-10\ h}$ of (26.087±0.672) $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ vs. (6.516±1.135) $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$; c_{\max} of (6.124±2.312) $\mu\text{g}/\text{L}$ vs. (1.592±0.051) $\mu\text{g}/\text{L}$. Compared with single drug group, $t_{1/2}$, $AUC_{0-10\ h}$ and c_{\max} of hypaconitine were decreased in drug combination group, with statistical significance ($P<0.05$). CONCLUSIONS: *R. palmatum* can inhibit the absorption of hypaconitine in rats, and speed up the elimination of it in rats.

KEYWORDS HPLC-MS; Hypaconitine; Heishun tablet; *Rheum palmatum*; Pharmacokinetics

附子是毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的干燥块根加工品,味辛、甘,性热,有毒^[1]。因为其生品有大毒,所以临床上多用其炮制品。黑顺片为附子的加工炮制品,其中毒性

成分乌头碱、中乌头碱的含量很低,主要的毒性成分为次乌头碱。附子配伍大黄为常用药对,源于张仲景的《金匮要略》中的“大黄附子汤”,方中以大黄苦寒攻下,附子辛热散寒,寒热

- [9] 曾名勇,崔海英,李八方.海洋生物活性肽及其生物活性研究进展[J].中国海洋药物,2005,24(1):46.
- [10] 刘力力,闫征,郭举,等.海鞘素简易结构类似物GJ7-1和GJ7-2的抗肿瘤活性及分子靶向研究[J].中国药房,2014,25(29):2 705.
- [11] 强薇,梅刚.真菌中环二肽及其衍生物的抗肿瘤活性研究进展[J].中国药房,2014,25(21):2 007.

- [12] Tabakmakher VM, Monastyrnaya MM, Leichenko EV, et al. Biologically active polypeptides of sea anemones: structure, function, and prospects for application[J]. *Russian Journal of Marine Biology*, 2013, 39(5): 311.
- [13] Fedorov S, Dyshlovoy S, Monastyrnaya M, et al. The anticancer effects of actinoporin RTX-A from the sea anemone heteractis crispa radianthus macrodactylus[J]. *Toxicol*, 2010, 55(4): 811.

* 主任药师。研究方向:医院药学。电话:028-61702675。E-mail:769257867@qq.com

(收稿日期:2015-04-07 修回日期:2015-06-03)
(编辑:林 静)

并用,相反相成,主治寒积便秘。现代化学和药理学研究表明,附子配伍大黄具有增效减毒的作用,但从药动学角度研究其配伍机制的报道甚少。为了探索其配伍机制,更好地了解附子配伍大黄中成分发挥药理作用的过程和机制,相应的药动学研究显得非常必要。笔者选取临床上常用的附子的炮制品黑顺片与大黄联用,采用高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)法,以盐酸巴马汀为内标,研究其对次乌头碱在大鼠体内药动学的影响。

1 材料

1.1 仪器

WatersZQ2000-LC-MS分析仪(美国Waters公司);1424-1型台式高速离心机、0412-1型台式低速离心机(上海医疗器械有限公司手术器械厂)。

1.2 药材、药品与试剂

黑顺片为毛茛科多年生草本植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的子根的炮制加工品,大黄为唐古特大黄 *Rheum tanguticum Maxim.ex Balf.* 的根及根茎,经笔者鉴定均为真品,购于四川省中药材饮片公司;次乌头碱对照品(上海东方药品科技实业有限公司,批号:110798-200404,含量测定用);盐酸巴马汀对照品(内标物,中国食品药品检定研究院,批号:110732-200506,含量测定用);甲醇、甲酸均为色谱纯,乙酸乙酯、氨水均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

1.3 动物

SD大鼠,SPF级,♂,体质量为230~250g,购于四川省人民医院实验动物研究,许可证号:SCXK(川)2008-24。

2 方法与结果

2.1 药液的制备

称取黑顺片100g,用10倍量水浸泡30min,煮沸后煮沸45min,称取大黄75g浸泡30min后,于黑顺片煮沸45min前15min下大黄,共同煎煮15min,过滤,滤液浓缩至100ml,得含黑顺片1g(生药)/ml的黑顺片-大黄合煎液。除不加入大黄外,其余按上述煎煮方法煎煮浓缩至100ml,得1g(生药)/ml的黑顺片单煎液。

2.2 给药与取血方案

取大鼠,适应性喂养1周后,随机分为单用(黑顺片单煎液)组和联用(黑顺片-大黄合煎液)组,每组18只,ig相应药物,给药剂量均以按黑顺片计为10g(生药)/kg。分别于给药前(0h)和给药后0.083、0.167、0.333、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8、10h经颈动脉插管处采血约0.3ml,每个时间点取6只,置于预先肝素化的1.5ml离心管中,以离心半径6.5cm(下同)、4000r/min离心5min,取上层血浆样品,于-20℃保存。

2.3 血浆样品的处理

取血浆样品160μl,加入20μl内标盐酸巴马汀溶液(800ng/ml),混匀,加入16μl氨水碱化后,混匀;加入5倍量的乙酸乙酯涡旋8min,于4℃下4000r/min离心5min,取上清液在38℃水浴条件下氮气流吹干;残渣用80μl50%甲醇溶解,进样测定。

2.4 检测条件

2.4.1 色谱条件 色谱柱:Phenomenex Gemini C₁₈ 110A(100

mm×2.0mm,5μm);流动相:甲醇(A)-水(B)(含0.1%甲酸)(28:72,V/V);流速:0.2ml/min;进样量:5μl;柱温:30℃。

2.4.2 质谱条件 离子源:电喷雾电离(ESI),正离子模式(ESI+)选择性离子监测(SIR)检测。毛细管电压:2.5kV;锥孔电压:45V;二级锥孔电压:1V;六级杆透镜电压:0.5V;ESI源温度:120℃;脱溶剂气温度:300℃;脱溶剂气流量:650L/h;锥孔气流量:50L/h。SIR检测:次乌头碱 *m/z* 616.02,巴马汀 *m/z* 352.31。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 分别取空白血浆、空白血浆+次乌头碱、两组大鼠ig药物后3h的血浆样品,除空白血浆不加内标外其余均按“2.3”项下方法处理,进样测定,记录色谱。结果表明,大鼠血浆中的内源性物质对测定无干扰,次乌头碱和巴马汀的保留时间分别为20.45、7.49min,二者分离度良好,响应值高。

2.5.2 线性关系考察 取1μg/ml的次乌头碱对照品溶液,用甲醇逐级稀释成质量浓度分别为0.8192、1.6384、4.096、10.24、25.6、64、160、400、800ng/ml的系列次乌头碱标准溶液。取160μl空白血浆,分别加入上述系列标准溶液20μl,混匀后,按照“2.3”项下方法处理后,使次乌头碱的终质量浓度分别为0.1024、0.2048、0.512、1.28、3.2、8、20、50、100ng/ml,进样测定,记录峰面积。以次乌头碱的质量浓度(*x*)为横坐标、次乌头碱与内标峰面积之比(*y*)为纵坐标进行加权($1/c^2$)最小二乘法计算,进行回归分析。得回归方程为 $y=0.1001x+0.0861$ ($r=0.9987$),表明次乌头碱检测质量浓度的线性范围为0.1024~100ng/ml;定量限为0.1ng/ml(信噪比为10)。

2.5.3 基质效应与提取回收率试验 取空白血浆160μl,共15份,按“2.5.2”项下方法制成次乌头碱质量浓度分别为0.2、3.2、85ng/ml的血浆样品,照“2.3”项下方法处理,每个浓度平行制备5份,进样测定,得次乌头碱与内标的峰面积比 y_1 ;取空白血浆160μl,共15份,按“2.3”项下方法处理后,加入次乌头碱对照品溶液和内标溶液制备成含次乌头碱质量浓度分别为0.2、3.2、85ng/ml的溶液,每个浓度平行制备5份,进样测定,得次乌头碱与内标的峰面积比 y_2 ;取次乌头碱质量浓度分别为0.2、3.2、85ng/ml的对照品溶液,每个浓度平行5份,共15份,加入20μl内标溶液,进样测定,得次乌头碱与内标的峰面积比 y_3 。以 y_1/y_2 计算提取回收率,以 y_2/y_3 计算基质效应。结果显示,提取回收率和基质效应均在85.0%~106.0%之间,均符合生物样品分析方法要求。

2.5.4 精密度试验 分别取空白血浆160μl,按“2.5.2”项下方法制成次乌头碱质量浓度分别为0.2、3.2、85ng/ml的血浆样品,照“2.3”项下方法处理,每个浓度平行制备5份,进样测定,连续测定3d。结果,日内RSD为6.45%($n=5$),日间RSD为8.36%($n=3$)。

2.5.5 稳定性考察 分别取空白血浆160μl,按“2.5.2”项下方法制成次乌头碱质量浓度分别为0.2、3.2、85ng/ml的血浆样品,照“2.3”项下方法处理,每个浓度平行制备5份,分别于室温放置8h、-20℃冻存1d、反复冻融3次,考察稳定性。结果显示,上述条件下次乌头碱的RSD均小于5.25%($n=5$)。

2.6 药动学参数计算

取“2.2”项下各时间点的血浆样品,按“2.3”项下方法处理后,进样测定,记录峰面积,绘制药-时曲线。利用DAS2.0.1药动学软件计算药动学参数。两组大鼠体内次乌头碱的药-时曲线见图1,药动学参数见表1。

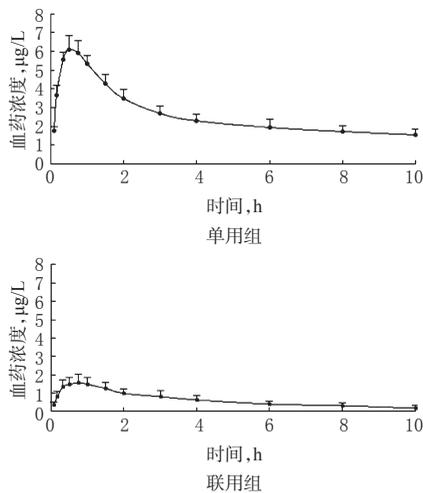


图1 两组大鼠体内次乌头碱的药-时曲线

Fig 1 Blood concentration-time curves of hypaconitine in rats of 2 groups

表1 两组大鼠体内次乌头碱的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of hypaconitine in rats of 2 groups($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 组别 | $t_{1/2}, h$ | $AUC_{0-10h}, \mu g \cdot h / L$ | t_{max}, h | $c_{max}, \mu g / L$ |
|-----|---------------------|----------------------------------|------------------|----------------------|
| 单用组 | 9.967 ± 1.123 | 26.087 ± 0.672 | 0.50 ± 0.086 | 6.124 ± 2.312 |
| 联用组 | $3.708 \pm 0.507^*$ | $6.516 \pm 1.135^*$ | 0.75 ± 0.132 | $1.592 \pm 0.051^*$ |

注:与单用组比较,* $P < 0.05$

Note:vs. single drug group,* $P < 0.05$

本实验按黑顺片生药量的等剂量给药,其中次乌头碱在黑顺片单煎液、黑顺片-大黄合煎液中的含量分别为126、72.4 $\mu g/kg$,用AUC与对应的次乌头碱给药剂量的比值表示大鼠体内次乌头碱的吸收程度,由此可得黑顺片单煎液、黑顺片-大黄合煎液中次乌头碱在大鼠体内的吸收程度分别为0.207、0.090 $g/(ml \cdot h)$ 。

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析。与单用组比较,联用组大鼠体内次乌头碱的 $t_{1/2}$ 、 AUC_{0-10h} 、 c_{max} 均减小($P < 0.05$),吸收程度呈下降趋势,说明大黄可以抑制次乌头碱在大鼠体内的吸收,加快其在体内的消除。

3 讨论

药-时曲线显示,次乌头碱在60 min内达到浓度最高峰,达

峰后又迅速降低,曲线逐渐缓和。这表明乌头类生物碱在大鼠体内吸收较为迅速,而且代谢速度较快。

本研究结果显示,与给予黑顺片水煎液相比,给予黑顺片-大黄合煎液后大鼠体内次乌头碱的 AUC_{0-10h} 和 c_{max} 均降低($P < 0.05$),且其吸收程度下降。虽然有报道中药之间配伍有吸收增强的结果^[2-3],但也有研究报道通过配伍后药物中的有效成分减少^[4-5],尤其是有毒的中药,这与本研究结果一致。

目前,大多都是用药效学或化学的角度研究黑顺片配伍大黄减毒的机制^[6-7],然而从药动学角度研究有毒中药配伍机制的较少。本实验从药动学的角度研究了其减毒的机制发现,大黄会抑制次乌头碱在大鼠体内的吸收,加快其在体内的消除,其具体机制还需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:177-178.
- [2] Xiao F, Li Q, Liang K, et al. Comparative pharmacokinetics of three triterpene acids in rat plasma after oral administration of poria extract and its formulated herbal preparation: GuiZhi-FuLing capsule[J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(1):117.
- [3] Tong L, Wan M, Zhou D, et al. LC-MS/MS determination and pharmacokinetic study of albiflorin and paeoniflorin in rat plasma after oral administration of radix paeoniae alba extract and Tang-Min-Ling-Wan[J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(12):1 324.
- [4] Yan R, Wang Y, Shen W, et al. Comparative pharmacokinetics of dehydroevodiamine and coptisine in rat plasma after oral administration of single herbs and Zuojinwan prescription[J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(8):1 152.
- [5] Wang CH, Cheng XM, Bligh SW, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of gentiopicoside from decoctions of gentianae and Longdan Xiegan Tang after oral administration in rats: comparison with gentiopicoside alone[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(5):1 113.
- [6] 越皓,皮子凤,赵宇峰,等.电喷雾串联质谱分析附子炮制中的化学成分变化[J]. *分析化学*, 2007, 35(7):959.
- [7] 越皓,皮子凤,宋凤瑞,等.附子不同配伍药对中生物碱成分的电喷雾质谱分析[J]. *药学报*, 2007, 42(2):201.

(收稿日期:2015-07-09 修回日期:2015-08-22)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅