

## LC-MS 法研究黄芪对附子 6 种乌头生物碱大鼠药代动力学的影响

刘玉婷<sup>1</sup>, 蒋且英<sup>2</sup>, 黄国勇<sup>1</sup>, 陈绪龙<sup>1</sup>, 廖正根<sup>1\*</sup>

(江西中医药大学 1. 现代中药制剂教育部重点实验室, 2. 实验动物科技中心, 江西 南昌 330004)

**摘要:** 研究黄芪-附子配伍对附子 3 种单酯型生物碱 (苯甲酰次乌头原碱 BHA、苯甲酰新乌头原碱 BMA、苯甲酰乌头原碱 BAC) 和 3 种双酯型生物碱 (次乌头碱 HA、新乌头碱 MA、乌头碱 AC) 的大鼠药代动力学的影响。采用 LC-MS 测定大鼠单次给药后不同时间血浆中药物浓度, DAS 3.3 求算药物的药代动力学参数, SPSS 13.0 软件分析附子配伍黄芪前后主要药动学参数差异。配伍黄芪后, 6 种生物碱的  $AUC_{0-t}$  和  $AUC_{0-\infty}$  均显著降低, 除 HA 外的 5 种生物碱的  $CL_z/F$  升高; 3 种单酯型生物碱  $C_{max}$  降低,  $t_{max}$  延长; BMA 和 MA 的分布容积 ( $V_z/F$ ) 增大。黄芪可以抑制附子生物碱的吸收, 诱导附子生物碱向全身分布, 并加快附子生物碱在体内的消除。本研究动物实验方案已获得江西中医药大学实验动物伦理委员会的批准。

**关键词:** 附子; 黄芪; 药代动力学; LC-MS

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)12-2289-07

## Determining the effect of Huangqi on the pharmacokinetics of six different alkaloids from Fuzi in rats by LC-MS

LIU Yu-ting<sup>1</sup>, JIANG Qie-ying<sup>2</sup>, HUANG Guo-yong<sup>1</sup>, CHEN Xu-long<sup>1</sup>, LIAO Zheng-gen<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, 2. Laboratory Animal Science and Technology Center of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**Abstract:** This study aimed to investigate the influence of combining Huangqi with Fuzi on the pharmacokinetics of six Aconitum alkaloids, *i. e.* aconitine (AC), hypaconitine (HA), mesaconitine (MA), benzoyleaconine (BAC), benzoylhypaconine (BHA) and benzoylmesaconine (BMA). The plasma concentrations of the drugs were determined by LC-MS for dose response and time dependent curves. The pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 3.3, and SPSS 12.0 was used to analyze the differences of main pharmacokinetic parameters between the two groups. Comparing with Fuzi group, the  $AUC_{0-t}$  and  $AUC_{0-\infty}$  of six alkaloids in Fuzi-Huangqi group was significantly decreased, the  $CL_z/F$  of six alkaloids except HA was significantly increased; the  $C_{max}$  was decreased and the  $t_{max}$  was prolonged in 3 monoester alkaloids, and the apparent volume of distribution of BMA and MA ( $V_z/F$ ) increases. These data indicated that Huangqi can inhibit the absorption of aconite alkaloids, induce the distribution of aconite alkaloids to the whole body, and accelerate the elimination of aconite alkaloids. The animal experiment scheme in this study has been approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine.

**Key words:** Fuzi; Huangqi; pharmacokinetics; LC-MS

收稿日期: 2019-05-17; 修回日期: 2019-07-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81660757); 江西省主要学科科学技术带头人培养计划 (20162BCB22015); 江西省卫生计生委科技计划 (20181140); 九江市科技计划 (2017109).

\*通讯作者 Tel: 86-791-87118658, E-mail: lyzlyg@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0294

附子始载于《神农本草经》, 中医临床应用历史悠久, 明代医圣张仲景将附子与人参、熟地黄、大黄列为“药中四维”, 清代名医郑钦安誉附子为“扶阳第一品药”, 近代名医祝味菊则称附子为“百药之长”, 可见附子在中医药中的重要地位, 但是, 附子毒性大, 治疗窗

比较狭窄,在临床上附子很少单独使用,常与其他药物联用期望达到减毒增效的目的。

综合药物吸收、分布、排泄和代谢的药物动力学行为是影响药物效应的重要环节,药物配伍应用可因相互改变药物的动力学行为而改变生物效应。黄芪是常用的益气补脾类中药,性甘,微温,临床上常和附子一起组成芪附汤治疗心力衰竭、心肌炎等<sup>[1]</sup>,甘能缓能和,可以显著降低附子的毒性<sup>[2]</sup>。本课题组前期研究表明黄芪可抑制附子生物碱的吸收<sup>[3]</sup>,亦有黄芪对药物代谢酶影响的研究报道<sup>[4-6]</sup>,尚未见到黄芪对附子整体药物动力学影响的报道。附子主要含生物碱、多糖、黄酮、芳香酸、甾醇、微量元素等成分<sup>[7,8]</sup>,其中乌头生物碱既是毒性成分又是药效成分,且有量-效关系<sup>[9]</sup>,为此,本文研究附子配伍黄芪前后附子6种生物碱(图1)的整体药物动力学行为以探讨黄芪是否可以降低附子生物碱的血药浓度而降低毒性,从而在一定程度上阐明芪附汤配伍的合理性。

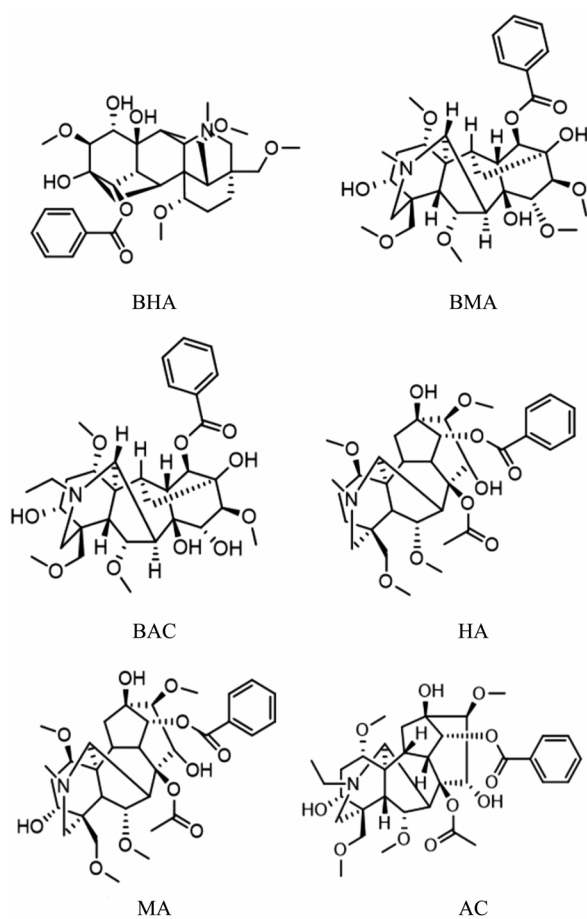
## 材料和方法

**药品和试剂** 苯甲酰次乌头碱(BHA, B-016-150928, 98%)、苯甲酰新乌头原碱(BMA, B-009-160330, 98%)、苯甲酰乌头原碱(BAC, B-010-171216, 98%)、次乌头碱(HA, C-023-150914, 98%)、新乌头碱(MA, X-011-160406, 98%)、乌头碱(AC, W-006-151225, 98%)、高乌甲素(Q-028-170427, 98%)均购自成都彼思特生物科技有限公司。黑顺片(批号20170717)、生黄芪(批号20180901)均购自江西江中中药饮片有限公司,并由江西中医药大学张寿文教授鉴定。乙腈、甲醇(色谱纯,德国Merck公司),甲酸(色谱纯,Aladdin公司),氯仿、乙酸乙酯(分析纯,西陇化工股份有限公司)。

**仪器** Agilent 1290-AB QTRAP 5500三重四极杆-线性离子阱液质联用(美国Agilent科技有限公司);十万分之一分析天平(德国Sartorius公司);Sigma3-18K型高速冷冻离心机(美国Sigma公司);氮吹仪(天津恒奥科技发展有限公司);IKA genius 3旋涡混合器(德国IKA集团)。

**动物** 雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠24只,体重200~230 g,江西中医药大学实验动物中心提供[许可证号:SCXK(赣)2018-0003]。标准环境下适应性饲养1周。本研究中动物实验方案已获得江西中医药大学实验动物伦理委员会的批准。

**色谱条件** 色谱柱为Agilent Zorbax Eclipse Plus C18柱(100 mm×2.1 mm, 3.5 μm),流动相水(A)-含0.1%甲酸的乙腈溶液(B),梯度洗脱:0~4 min, 5%~40% B; 4~5 min, 40% B; 5~5.1 min, 40%~5% B;



**Figure 1** Chemical structures of 6 aconite alkaloids. BHA: Benzoylhypaconine; BMA: Benzoylmesaconine; BAC: Benzoylaco-nine; HA: Hypaconitine; MA: Mesaconitine; AC: Aconitine

5.1~7 min, 5% B; 体积流量 0.4 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温 30 °C, 进样量 5 μL。

**质谱条件** 采用正离子电喷雾电离模式(ESI+)检测,检测模式为多反应监测(MRM),离子化电压(IS) 5.5 kV;离子源温度(TEM)为550 °C;气帘气(CUR)为241.35 kPa(35 psi);喷雾气(GS1)为344.75 kPa(50 psi);其他特征参数列于表1。

**对照品储备溶液的配制** 取BHA、BMA、BAC、HA、MA、AC对照品适量,精密称取,分别置于10 mL量瓶中,加异丙醇-二氯甲烷(1:1)稀释至刻度,制成质量浓度分别为343、358、363、342、331和334 μg·mL<sup>-1</sup>对照品溶液。各精密量取10 μL于10 mL量瓶中,乙腈稀释至刻度,得质量浓度为343、358、363、342、331和334 ng·mL<sup>-1</sup>的混合对照品母液,避光储存于4 °C冰箱。精密量取1 665 μL混合对照品母液于5 mL量瓶,乙腈稀释至刻度,得质量浓度分别为114、119、121、114、110和111 ng·mL<sup>-1</sup>的标准工作液1号。乙腈逐级2倍稀释,得到系列标准工作液2~11号。

**Table 1** Mass spectrometry selection channel and related parameters. IS: Lappaconitine

Compd.	Precursor ion	Product ion	DP/V	CE/V
BHA	574.4 [M+H] <sup>+</sup>	542.4 [M+H-CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup>	120	48
BMA	590.3 [M+H] <sup>+</sup>	540.3 [M+H-CH <sub>3</sub> OH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	120	50
BAC	604.4 [M+H] <sup>+</sup>	554.4 [M+H-H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup>	120	50
HA	616.0 [M+H] <sup>+</sup>	556.4 [M+H-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup>	110	46
MA	632.0 [M+H] <sup>+</sup>	572.0 [M+H-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup>	100	47
AC	646.0 [M+H] <sup>+</sup>	586.2 [M+H-CH <sub>3</sub> COOH] <sup>+</sup>	120	47
IS	585.1 [M+H] <sup>+</sup>	356.2 [M+H-H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> OH-C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> NO] <sup>+</sup>	120	45

精密称取高乌甲素 10.86 mg, 乙腈溶解并定容至 25 mL 量瓶。乙腈稀释得到浓度为 434 ng·mL<sup>-1</sup> 的高乌甲素溶液 (内标)。

**血浆样品处理方法** 精密吸取血浆样品 100 μL, 定量加入氨水 30 μL 和内标 (434 ng·mL<sup>-1</sup>) 10 μL, 涡旋 30 s 后加入乙酸乙酯 1 mL 萃取, 涡旋混匀 5 min, 于 16 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 取上层有机相, 氮气吹干。残渣用流动相 100 μL 复溶, 涡旋 1 min, 于 16 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 取上清液按上述色谱条件进样测定。

#### 方法学考察

**专属性** 取 6 个不同来源的大鼠空白血浆, 除不加内标溶液 (等体积的乙腈代替) 外, 其余按“血浆样品处理方法”项下操作, 进行 LC-MS/MS 分析, 并记录相应的色谱图。通过比较大鼠空白血浆样品、定量下限 (LLOQ) 血浆样品和大鼠灌胃 FH 组药液后的血浆样品, 考察该方法的专属性。

**线性与定量限考察** 取空白血浆 100 μL, 分别加入 1~11 号标准工作液 10 μL, 使血浆中 BHA 的质量浓度分别为 0.011 2、0.022 3、0.044 7、0.089 3、0.179、0.357、0.715、1.43、2.86、5.72 和 11.4 ng·mL<sup>-1</sup>, BMA 的质量浓度分别为 0.011 7、0.023 3、0.046 6、0.093 2、0.186、0.373、0.746、1.49、2.98、5.97 和 11.9 ng·mL<sup>-1</sup>; BAC 的质量浓度分别为 0.011 8、0.023 6、0.047 3、0.094 5、0.189、0.378、0.756、1.51、3.03、6.05 和 12.1 ng·mL<sup>-1</sup>; HA 的质量浓度分别为 0.011 1、0.022 3、0.044 5、0.089 1、0.178、0.356、0.713、1.43、2.85、5.70 和 11.4 ng·mL<sup>-1</sup>; MA 的质量浓度分别为 0.010 8、0.021 5、0.043 1、0.086 2、0.172、0.345、0.690、1.38、2.76、5.52 和 11.0 ng·mL<sup>-1</sup>; AC 的质量浓度分别为 0.0109、0.021 7、0.043 5、0.087 0、0.174、0.348、0.696、1.39、2.78、5.57 和 11.1 ng·mL<sup>-1</sup>, 内标质量浓度为 43.4 ng·mL<sup>-1</sup>, 按“血浆样品处理方法”项下操作。以待测物质量浓度为横坐标  $x$ , 待测物与内标的峰面积比值为纵坐标  $y$ , 用加权最小二乘法进行回归运算, 得到各成分的标准曲线和线性范围, 以血浆标准曲线的最低浓度点作为定量下限 (LLOQ)。

**准确度和精密度考察** 取空白血浆 90 μL, 加入不同质量浓度的混合对照品溶液 10 μL, 配制成 BHA 0.179、

1.43 和 11.4 ng·mL<sup>-1</sup>, BMA 0.186、1.49 和 11.9 ng·mL<sup>-1</sup>, BAC 0.189、1.51 和 12.1 ng·mL<sup>-1</sup>, HA 0.178、1.43 和 11.4 ng·mL<sup>-1</sup>, MA 0.172、1.38 和 11.0 ng·mL<sup>-1</sup>, AC 0.174、1.39 和 11.1 ng·mL<sup>-1</sup> 的低、中、高浓度 QC 样品, 各浓度水平均为 6 样本, 按照“血浆样品处理方法”项下方法处理后测定。代入随行标准曲线计算相应的药物浓度, 与理论值相比, 计算方法的准确度; 同一质量浓度每隔 1 h 测 1 次, 测定 3 次, 进行日内精密度计算; 每隔 1 天测定 1 次, 连续测定 3 天, 进行日间精密度计算。

**回收率与基质效应** 配制低、中、高 3 个浓度的质控样品, 各浓度水平均为 6 样本, 按“血浆样品处理方法”项下处理后, 测定的样品所得峰面积  $A_1$ ; 取空白血浆 100 μL, 按照“血浆样品处理”项下方法处理至氮气吹干后用含低、中、高浓度混合对照品的甲醇溶液复溶, 检测并记录峰面积  $A_2$ ; 用含低、中、高浓度混合对照品的甲醇溶液直接进样, 记录相应的峰面积  $A_3$ 。 $A_1$  和  $A_3$  的比值即绝对回收率,  $A_2$  和  $A_3$  的比值为基质效应。

**稳定性及冻融稳定性** 配制低、中、高 3 个浓度的质控样品, 各浓度水平均为 6 样本, 按“血浆样品处理方法”项下处理后, 进行以下 3 种稳定性方法处置: ① 20 °C 室温放置 12 h; ② 贮存于 -80 °C 冰箱 3 天; ③ 贮存于 -80 °C 冰箱, 反复冻融 3 次。

**中药浸膏的制备** 附子干浸膏: 称取一定量黑顺片, 浸泡 30 min, 10 倍水加热回流两次, 每次 1 h, 合并两次滤液, 浓缩后冷冻干燥得干膏, 出膏率为 4.94%, HPLC 测得浸膏 BHA、BMA、BAC、HA、MA、AC 的含量分别为 1.45%、2.47%、1.62%、0.270%、0.322%、0.141%。

黄芪干浸膏: 称取一定量黄芪, 浸泡 30 min, 10 倍水加热回流两次, 每次 1 h, 合并两次滤液, 浓缩, 真空干燥, 得干膏, 出膏率为 39.7%, HPLC 测得浸膏毛蕊异黄酮的含量 0.098 0%, 黄芪甲苷含量为 0.431%。

**灌胃药液的制备** 称取 CMC-Na 5 g, 溶于沸水 1 L 中, 配成 0.5% 的溶液。分别精密称取下述两组药物适量, 加入 0.5% CMC-Na 溶液, 涡旋混匀, 制成附子干浸膏质量浓度均为 25 mg·mL<sup>-1</sup> 的混悬液, 大鼠灌胃剂量 10 mL·kg<sup>-1</sup>。

附子组 (F): 称取附子干浸膏 2.5 g, 以 0.5% CMC-

Na为溶剂配制成100 mL; 附子-黄芪组(FH): 称取附子干浸膏2.5 g、黄芪干浸膏20 g, 以0.5% CMC-Na为溶剂配制成100 mL。

### 药动学研究

**单酯型生物碱** 大鼠禁食12 h, 灌胃给药, 灌胃给予各组药物的CMC-Na混悬液, 并于给药后2、5、10、15、30、45、60、75和90 min眼眶静脉取血0.3 mL至肝素化微量离心管, 以5 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min, 取上清液, -80 °C储存。

**双酯型生物碱** 大鼠禁食12 h, 灌胃给药, 灌胃给予各组药物的CMC-Na混悬液, 并于给药后2、5、15、30、45、60、75、90、120、180 min眼眶静脉取血0.3 mL至肝素化微量离心管, 以5 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min, 取上清液, -80 °C储存。

**数据处理** 将给药后的血浆样品按照“血浆样品处理方法”进行处理后进行LC-MS/MS分析, 以随行校正曲线计算血浆药物浓度后将血药浓度时间数据带入DAS 3.3药代统计学软件求算6种生物碱在大鼠体内的各项药代动力学参数, 并以SPSS 13.0统计附子提取物与附子黄芪配伍组的主要药动学参数差异。

## 结果

### 1 方法学验证

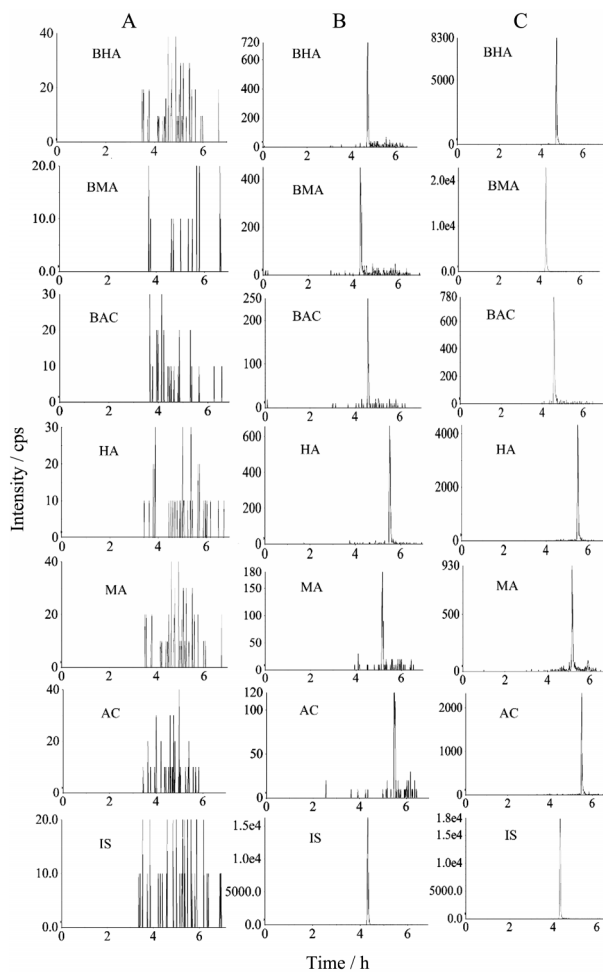
**1.1 专属性** 空白血浆样品的色谱图见图2A, LOQ样品的色谱图见图2B, 大鼠给药后样品的代表性色谱图见图2C。BHA、BMA、BAC、HA、MA、AC、IS的色谱保留时间分别为4.75、4.3、4.35、5.5、5.2、5.5和4.3 min。结果表明, 干扰组分的响应低于LLOQ响应的20%及内标响应的5%, 表明附子6种生物碱及内标的峰形良好, 大鼠空白血浆中的内源性物质不干扰待测物和内标的定量分析, 本方法具有良好的专属性。

**1.2 线性与定量限考察** 附子6种生物碱在大鼠血浆中的线性范围内线性良好, 结果见表2。

**1.3 准确度和精密度** 附子6种生物碱各浓度QC样品准确度平均在94.0%~106.0%之间, 日内精密度(RSD)在5.81%~9.28%之间和日间精密度在7.64%~

**Table 2** Regression data and lower limit of quantification (LLOQ) for six alkaloids

Compd.	Calibration graph	$r^2$	Linear range /ng·mL <sup>-1</sup>	LLOQ /ng·mL <sup>-1</sup>
BHA	$y = 0.3797x + 0.0174$	0.9989	0.0112–11.4	0.0112
BMA	$y = 0.1808x + 0.0251$	0.9979	0.0117–11.9	0.0117
BAC	$y = 0.1455x + 0.0057$	0.9994	0.0118–12.1	0.0118
HA	$y = 0.27x + 0.028$	0.9986	0.0111–11.4	0.0111
MA	$y = 0.3972x + 0.0043$	0.9989	0.0108–11.0	0.0108
AC	$y = 0.3027x + 0.0198$	0.9984	0.0109–11.1	0.0109



**Figure 2** The typical chromatogram of 6 aconite alkaloids in rat plasma. A: Blank rat plasma sample; B: LLOQ sample; C: A rat plasma sample collected at 30 min after the oral administration of FH (fuzi-huangqi group) aqueous extracts

14.6%之间, 均符合有关生物样品分析方法验证的要求。

**1.4 回收率与基质效应** 6种生物碱和内标在3个浓度水平上的基质效应均在93.0%~108.2%之间, 说明基质效应不会对样品的分析产生影响。回收率均在63.3%~80.5%之间, 符合生物样品分析要求。

**1.5 稳定性及冻融稳定性** 结果测得实际值均在理论值的91.8%~107.6%之间波动, 表明样品在以上条件下稳定。

### 2 药代动力学

以标准曲线法计算血药浓度, 将平均血药浓度对时间作图, 得平均血药浓度-时间曲线(图3), 单酯型生物碱药代动力学参数结果见表3, 双酯型生物碱结果见表4。

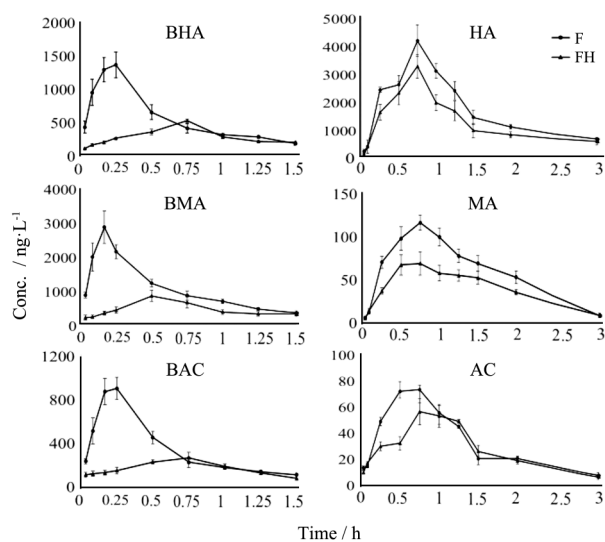
平均血药浓度-时间曲线图表明, 配伍组较附子单药组的血药浓度明显低。药动学参数计算结果显示,

**Table 3** The pharmacokinetic parameters of 3 monoester alkaloids in rat plasma after oral administration of F and FH aqueous extracts ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs F

Compd.	Group	$AUC_{0-t}/ng \cdot h \cdot L^{-1}$	$AUC_{0-\infty}/ng \cdot h \cdot L^{-1}$	$t_{1/2z}/h$	$t_{max}/h$	$V_z/F/L \cdot kg^{-1}$	$CL_z/F/L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	$C_{max}/ng \cdot L^{-1}$
BHA	F	861.98 ± 117.43	1 069.67 ± 168.62	0.73 ± 0.64	0.19 ± 0.07	3 356.27 ± 2 215.38	3 454.21 ± 501.63	1 593.55 ± 252.53
	FH	439.09 ± 61.04**	527.29 ± 81.44**	0.42 ± 0.18	0.71 ± 0.10**	4 207.74 ± 1 583.92	7 004.85 ± 1 021.27**	531.56 ± 177.10**
BMA	F	1 799.76 ± 184.10	2 359.28 ± 599.49	0.97 ± 0.90	0.15 ± 0.03	3 267.82 ± 2 088.36	2 739.98 ± 581.96	3 269.80 ± 667.10
	FH	742.29 ± 208.34**	932.42 ± 251.29**	0.58 ± 0.31	0.50 ± 0.16**	5 840.03 ± 3 200.66*	7 149.61 ± 2 455.74**	935.98 ± 369.87**
BAC	F	584.01 ± 92.80	700.81 ± 101.76	0.87 ± 0.50	0.22 ± 0.04	7 043.14 ± 3 528.62	5 884.10 ± 873.10	1 035.85 ± 143.79
	FH	276.78 ± 31.62**	348.81 ± 66.93**	0.53 ± 0.24	0.67 ± 0.13**	8 736.34 ± 2 794.22	11 918.44 ± 1 940.26**	310.06 ± 82.48**

**Table 4** The pharmacokinetic parameters of 3 diester alkaloids in rat plasma after oral administration of F and FH aqueous extracts ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ ). \* $P < 0.05$  vs F

Compd.	Group	$AUC_{0-t}/ng \cdot h \cdot L^{-1}$	$AUC_{0-\infty}/ng \cdot h \cdot L^{-1}$	$t_{1/2z}/h$	$t_{max}/h$	$V_z/F/L \cdot kg^{-1}$	$CL_z/F/L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	$C_{max}/ng \cdot L^{-1}$
HA	F	5 283.18 ± 304.33	6 568.10 ± 501.91	1.36 ± 0.42	0.75 ± 0.00	200.25 ± 56.35	103.45 ± 8.87	4 286.52 ± 656.12
	FH	4 234.63 ± 823.12*	5 119.99 ± 1 171.43*	1.10 ± 0.58	0.70 ± 0.10	205.49 ± 81.32	141.92 ± 44.67	3 690.75 ± 560.44
MA	F	191.80 ± 42.95	230.58 ± 48.29	1.06 ± 0.43	0.79 ± 0.19	5 576.65 ± 2 885.74	3 621.50 ± 873.22	130.69 ± 33.05
	FH	131.12 ± 26.28*	163.02 ± 31.96*	1.08 ± 0.26	0.75 ± 0.27	7 832.26 ± 1 970.27*	5 105.54 ± 1 227.78*	84.83 ± 26.55*
AC	F	108.62 ± 7.13	128.07 ± 16.21	0.99 ± 0.26	0.70 ± 0.19	3 862.94 ± 672.75	2 779.12 ± 364.88	85.33 ± 13.37
	FH	91.58 ± 11.37*	102.52 ± 14.53*	0.73 ± 0.32	0.88 ± 0.21	3 517.13 ± 1 359.36	3 469.12 ± 473.66*	72.06 ± 19.63

**Figure 3** Mean plasma concentration-time curves of the six alkaloids after oral administration of F (fuzi group) and FH (fuzi-huangqi group) aqueous extracts

配伍黄芪后, 6种生物碱的 $AUC_{0-t}$ 和 $AUC_{0-\infty}$ 均显著降低, 除HA外的5种生物碱的 $CL_z/F$ 升高; 3种单酯型生物碱 $C_{max}$ 降低,  $t_{max}$ 延长; BMA和MA的分布容积( $V_z/F$ )增大。

## 讨论

芪附汤首载于《魏氏家藏》一书, 由黄芪、炮附子组成, 有益气固表, 温阳敛汗之功, 现主要用于治疗冠心病、心绞痛等<sup>[1]</sup>, 关于其配伍原理的报道较少, 文献报道黄芪和附子以1:1配伍组成的芪附汤有抗心肌缺血<sup>[10]</sup>、增强免疫<sup>[11]</sup>、抗衰老作用<sup>[12]</sup>, 其用于心肌缺血时以1:1配比药效最优<sup>[13]</sup>, 故本文研究黄芪以1:1配伍附

子后对附子生物碱药代动力学影响的角度探讨芪附汤的配伍原理。研究结果显示配伍黄芪能不同程度地降低附子6种生物碱的血药浓度和 $C_{max}$ , 由于附子生物碱有毒且呈量效关系<sup>[9]</sup>, 因此配伍黄芪后应能降低附子毒性, 这与从毒理学研究结果显示的黄芪可降低附子毒性的结果一致<sup>[2]</sup>, 从而从药理学角度阐明了芪附汤配伍的合理性。

$AUC$ 、 $C_{max}$ 和 $t_{max}$ 分别可作为吸收程度与吸收速度的指标<sup>[14,15]</sup>。吸收程度降低会导致 $AUC$ 和 $C_{max}$ 降低, 吸收速度下降会导致 $C_{max}$ 降低、 $t_{max}$ 增加。配伍黄芪后, 附子6种生物碱的 $AUC$ 和 $C_{max}$ 均有不同程度的降低, 大多生物碱 $t_{max}$ 均有不同程度的增加, 说明黄芪抑制附子生物碱的吸收速度和吸收程度是降低其血药浓度的重要原因。

附子生物碱是外排转运体(如P-gp、BCRP、MRP<sub>2</sub>等)的底物<sup>[16]</sup>, 可因外排转运体的外排而减少吸收, 而黄芪及其主要活性成分黄芪甲苷IV(AS-IV)、毛蕊花素(CS)和芒柄花素(FMNT)均可上调P-gp、MRP和BCRP表达水平, 诱导转运蛋白表达, 促进底物药的底物外排作用<sup>[17,18]</sup>。因此, 黄芪抑制附子生物碱的吸收可能与黄芪诱导外排转运蛋白表达相关。

尽管黄芪对附子6种生物碱的 $AUC$ 和 $C_{max}$ 均有不同程度的降低, 但从药代动力学曲线来看, 黄芪对双酯型生物碱吸收相的影响要少于单酯型生物碱的影响, 这种差异除黄芪对转运蛋白的影响外, 也可能与黄芪抑制了肠液中酯酶的活性或改变2类生物碱在肠液中的存在状态有关, 这方面的工作有待于进一步研究。

$V_z/F$ 和 $CL_z/F$ 分别是药物分布程度和体内药物消除速度的评价指标<sup>[19]</sup>。表观分布容积和清除率增大会

导致血药浓度以及  $C_{\max}$  降低, 配伍黄芪后, 附子 6 种生物碱的表观分布容积和清除率均有不同程度的增加, 这表明配伍黄芪后附子生物碱血药浓度的降低不仅与吸收减少有关, 还与黄芪促进附子向全身分布以及清除有关。

CYP3A4、CYP1A1、CYP2E1 等药物代谢酶参与了附子的代谢<sup>[20-24]</sup>, 黄芪促进附子的清除可能与黄芪诱导相应代谢酶的活性有关。目前关于黄芪对代谢酶影响的报道主要是黄芪及其主要生物活性成分对代谢酶表达的影响<sup>[17]</sup>, 而酶的表达要一定的时间过程, 故黄芪是否可诱导代谢酶的活性有待于进一步研究。

预实验结果发现, 单酯型生物碱和双酯型生物碱的吸收相、平衡相、消除相的时间不一致, 故本实验将单酯型和双酯型生物碱分别采血, 以期更准确的反映附子 6 种生物碱的吸收代谢特征。本实验采用液液萃取法处理生物样品, 实验比较了乙腈、乙酸乙酯、甲醇、氯仿 4 种萃取溶剂的处理效果。结果表明, 以乙酸乙酯作为萃取溶剂时, 所测 6 种成分的提取率较大, 且 6 种成分的提取率比较接近, 内源性物质干扰程度较少, 重现性好, 在氮气吹干过程中也较省时, 因此选用乙酸乙酯为本实验样品的萃取溶剂。实验中采用 LC-MS 技术, 通过选择性检测样品和内标的分子离子峰进行定量, 建立了快速同时测定大鼠血浆中 6 种生物碱浓度的方法, 方法学考察结果表明, 该方法灵敏度高、重复性好、操作简便、结果准确, 具有较高的专属性, 符合生物样品分析要求。

## References

- [1] Yuan MS. The pharmacological action and clinical application of Qifu Decoction [J]. Chin Med Mod Distance Edu China (中国中医药现代远程教育), 2009, 7: 6-8.
- [2] Zhang GP, Jie SH, Zhu XG, et al. Experimental study on combination attenuation of mutual-detoxication and mutual restraint about Aconiti Carmichaeli Radix [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2012, 37: 2215-2218.
- [3] Kong XQ, Jiang QY, Luo Y, et al. Effect of Radix Astragali and Aconiti Lateralis Radix Preparata on intestinal absorption of six kinds of alkaloids in Aconiti Lateralis Radix Preparata [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 4928-4934.
- [4] Shan WY. Metabolism of the Active Ingredient Astragalus and Oridonin by Liver Microsome *in vitro* (黄芪有效成分和冬凌草甲素的体外肝微粒体代谢研究) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012.
- [5] Zhang YH. Effect of Astragaloside IV on CYP1A2 Enzyme Activity in Rats (黄芪甲苷对大鼠 CYP1A2 酶活性影响的研究) [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2012.
- [6] Wei BH. Metabolic Transformation of Cyclodextrone in Rats and Its Effect on Liver CYP450 Enzyme (环黄芪醇大鼠体内代谢转化及对肝脏 CYP450 酶的影响) [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2014.
- [7] Peng C. Thought and practice of multidimensional evaluation and integrated analysis on toxicity and efficacy of Radix Aconiti Lateralis Praeparata [J]. World Chin Med (世界中医药), 2017, 12: 2543-2550.
- [8] Tang M, Zhao LC, Xu M, et al. Chemical constituents and pharmacological activities of Aconiti Lateralis Radix Praeparata [J]. Guihaia (广西植物), 2017, 37: 1614-1627.
- [9] Zhang SF. Cardiotoxicity Relationship of Three Diester Alkaloids in Aconite and Intervention of Glycyrrhizin (附子中三种双酯型生物碱的心脏毒效关系及甘草苷的干预作用) [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2007.
- [10] Zhu J, Li G, Chen LY. Study effects of ST change about Qifu decoction in myocardial ischemia-reperfusion injury rats by BP neural network [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2015, 26: 1582-1584.
- [11] Dong Q, Lu YD, Wu MW. Effect of Qifu decoction and its combination on immune function of Yang deficiency mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 1999, 5: 17-19.
- [12] Dong Q, Wu MW. Study on the anti-aging mechanism of Qifu decoction in aged mice [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床), 1997, 13: 8-9.
- [13] Su YB. Study on the Effects of Qifu Decoction and Its Different Ratios on Acute Experimental Myocardial Ischemia in Rats (芪附汤及其不同配比对大鼠急性实验性心肌缺血影响的研究) [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2007.
- [14] Chen ZY, Zheng QS, Shun RY, et al. Functions of the DAS software for pharmacological calculation [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学与治疗学), 2002, 7: 562-564.
- [15] Huang SK, Han KQ. Statistical approaches for assessment of bioequivalence [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 1994, 29: 312-314.
- [16] Yang XS. The Effect of CYP450 and Efflux Transporter (BCRP, MRP2) Mechanism on Monoester-Diterpene Alkaloids and Alcohol Amine-Diterpene Alkaloids Disposition (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]. Luzhou: Southern Medical University, 2014.
- [17] Zhang G, Ou R, Li F, et al. Regulation of drug-metabolizing enzymes and efflux transporters by Astragali radix decoction and its main bioactive compounds: implication for clinical drug-drug interactions [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 180: 104-113.
- [18] Lou Y, Guo Z, Zhu Y, et al. Astragali radix and its main bioactive compounds activate the Nrf2-mediated signaling pathway to induce P-glycoprotein and breast cancer resistance protein [J]. J

- Ethnopharmacol, 2019, 228: 82-91.
- [19] Liang WQ, Li G, Liu JP. Biopharmaceutics and Pharmacokinetics (生物药剂学与药物动力学) [M]. 3rd Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007: 176.
- [20] Ye L, Yang XS, Lu LL, et al. Monoester-diterpene aconitum alkaloid metabolism in human liver microsomes: predominant role of CYP3A4 and CYP3A5 [J]. Evid-Based Compl Alter Med, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/941093>.
- [21] Tang L, Ye L, Lv C, et al. Involvement of CYP3A4/5 and CYP2D6 in the metabolism of aconitine using human liver microsomes and recombinant CYP450 enzymes [J]. Toxicol Lett, 2011, 202: 47-54.
- [22] Wang Y, Wang S, Liu Y, et al. Characterization of metabolites and cytochrome P450 isoforms involved in the microsomal metabolism of aconitine [J]. J Chromatogr B, 2006, 844: 292-300.
- [23] Ye L, Tang L, Gong Y, et al. Characterization of metabolites and human P450 isoforms involved in the microsomal metabolism of mesaconitine [J]. Xenobiotica, 2011, 41: 46-58.
- [24] Ye L, Wang T, Yang C, et al. Microsomal cytochrome P450-mediated metabolism of hypaconitine, an active and highly toxic constituent derived from Aconitum species [J]. Toxicol Lett, 2011, 204: 81-91.