



常态及虚寒状态小鼠体内次乌头碱的血药浓度差异研究

杨媛, 黄建梅, 刘小青, 白梅荣, 马长华, 张冰*

(北京中医药大学 中药学院, 北京 100102)

[摘要] **目的:**对比研究虚寒状态和常态小鼠血清中次乌头碱浓度差异,分析不同机体代谢环境的差异,在代谢层面说明药物毒性发生与机体的代谢环境有关。**方法:**复制小鼠虚寒状态模型,连续给予附子水煎液 14 d,用 HPLC 检测第 1,7,14 天虚寒状态及常态小鼠血清中次乌头碱的浓度;同时观察小鼠的存活率。**结果:**附子水煎液对虚寒状态小鼠机体代谢起调节作用,给药 14 d 后,其血药浓度恢复或接近正常组水平;附子水煎液对常态组小鼠的体内代谢环境存在扰动,给药 7,14 d 的血药浓度均比第 1 天高;在 14 d 的给药周期内,虚寒组血药浓度的变化范围小于正常组。附子水煎液灌胃后第 7 天及第 14 天,虚寒状态组小鼠的存活率明显高于常态组小鼠。**结论:**常态及虚寒状态小鼠血药浓度的差异提示常态和虚寒状态小鼠的代谢环境存在差异,代谢环境在给予附子水煎液的过程中发生改变。实验结果在一定程度上说明附子在临床上产生毒性的剂量不同与机体的代谢环境不同有关。

[关键词] 次乌头碱;虚寒状态;血药浓度;代谢环境

附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 子根的加工品,具有回阳救逆、补火助阳、逐风寒湿邪的功效。附子生用有大毒,多炮制加工降毒后入药。本实验选取附子作为有毒中药的代表,研究有毒中药毒性与机体状态的关系^[1]。从化学成分上看,乌头碱型生物碱^[2]如乌头碱(aconitine),次乌头碱(下乌头碱 hypaconitine),新乌头碱(中乌头碱 mesaconitine),既是附子的生理活性物质,也是毒性物质,因此比较该类生物碱在不同机体状态动物体内的血药浓度的差异,可在一定程度反应不同机体状态对药物的代谢存在差异,即机体的代谢环境有差异^[3]。

本实验采用符合中医临床附子适应症的虚寒状态小鼠模型,模拟临床中药汤剂治疗周期,予以常态和虚寒状态组小鼠附子水煎液灌胃 1,7,14 d 后,检测虚寒状态小鼠和常态小鼠血清中次乌头碱浓度。在给药周期内,通过考察血药浓度以及存活率的差异,试图说明不同状态的代谢环境是否存在差异,而且考察在给药的过程中,机体的代谢环境是否发生

变化^[4]。

1 材料

1.1 动物 ICR 小鼠,雄性,体重(26 ± 2) g,240 只,购自北京维通利华实验动物中心,合格证号 SCXK(京)2002-003。

1.2 仪器 Agilent1100 高效液相色谱仪(VWD 检测器)、分析柱 phenomennex 00F-4435-E0 C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm,5 μm)、预柱 Dikma RP18 (4.6 mm × 10 mm,5 μm);SPE 固相萃取小柱:agela technologies cleanert ODS-SPE;SHIMADZU UV-120-02 紫外-可见分光光度计。

1.3 药物与试剂 氢化可的松注射液(羚羊药物有限公司,批号 2007-12-08);附子水煎液由北京中医药大学中药学院中药分析教研室提供;甲醇(色谱纯);三乙胺、冰醋酸(分析纯,北京化学试剂厂);乌头碱(批号 110720-200410)、次乌头碱(批号 110798-200404)、新乌头碱(批号 110799-200404)均购自中国药品生物制品检定所。

2 方法

2.1 虚寒动物造模 雄性 ICR 小鼠(30 mg · kg⁻¹)240 只,随机分为 6 组,常态 3 组和虚寒状态 3 组,每组 40 只。从实验第 1 天开始,虚寒状态组小鼠肌肉注射氢化可的松注射液(30 mg · kg⁻¹),常态组小鼠肌肉注射等容量的生理盐水。

[稿件编号] 20090923011

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2007CB512605)

[通信作者] * 张冰,教授,博导,Tel:(010)84738662,E-mail:zhangbing6@263.net



每天 1 次,共 14 d。每天观察小鼠毛色、反应及活动情况;每 2 天测 1 次肛温、称 1 次体重、摄入量及饮水量。与常态组相比,虚寒状态组体重、肛温、饮水量和摄入量明显降低,结果见表 1,2。

根据本课题组对小鼠虚寒模型塑造的情况,除了上述外观指标发生改变,血浆 17-OHCS 也明显降低,血浆 cAMP 含量下降、cGMP 含量升高、cAMP/cGMP 降低^[5]。

表 1 常态和虚寒状态小鼠体重比较($\bar{x} \pm s$)

g

组别	第 1 天	第 4 天	第 7 天	第 10 天	第 14 天
正常状态	29.04 ± 0.98	29.65 ± 0.93	30.57 ± 1.75	32.35 ± 2.10	33.43 ± 2.63
虚寒状态	29.23 ± 1.38	28.23 ± 1.36 ²⁾	28.17 ± 1.21 ³⁾	27.93 ± 1.28 ³⁾	27.87 ± 1.15 ³⁾

注:与正常状态组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.001$ (表 2 同)。

表 2 常态和虚寒状态小鼠肛温比较($\bar{x} \pm s$)

°C

组别	第 1 天	第 4 天	第 7 天	第 10 天	第 14 天
正常状态	37.82 ± 0.48	37.49 ± 0.41	37.59 ± 0.31	37.22 ± 0.53	37.85 ± 0.57
虚寒状态	37.71 ± 0.36	36.78 ± 0.48 ¹⁾	36.82 ± 0.34 ¹⁾	36.95 ± 0.17 ¹⁾	36.88 ± 0.47 ¹⁾

2.2 模型组和正常组动物给药及取血 模型成功后,虚寒状态组小鼠仍然肌肉注射氢化可的松注射液($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),常态组小鼠肌肉注射等容量的生理盐水,此外,各组动物均灌胃附子水提物(以生药材计 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每天灌胃 1 次。为了动态观察常态和虚寒状态下血药浓度,选择 3 个给药周期(分别是给药 1 次、连续给药 7 次、14 次)和 1 个取血时间点(分别给药后 10 min)。常态和虚寒状态各 3 组小鼠分别在给药 1 次、7 次、14 次后 10 min 断头取血, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心分离血清,以高效液相色谱检测血清中次乌头碱含量,约 5~8 只小鼠的血样混合获得 1 个血药浓度数据。

取血时间的确定依据如下:文献报道实验动物多为大鼠,如肖凤霞^[6]等报道大鼠尾静脉注射四逆注射剂 $1.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以乌头生物碱计算的剂量为 $0.533 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)后 0.083, 0.167, 0.333, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 h 处死, $t_{1/2}$ 为 0.996 h。而王梦德^[7]等用药理学的方法求出腹腔注射予以生草乌煎剂后相应时间的体存量,记录时间分为 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 h,结果显示 0.5 h 体存量为 40.2%,1 h 后存体量仅为 25%。因此,考虑在给药后 1 h 之内取血,取血时间为 5, 10, 15, 20, 30 min。在此条件下只能检测到服药后 10 min 处死的小鼠血清中的次乌头碱,其他时间点处死的小鼠血清中未检测到乌头碱类生物碱成分。因此,选择灌胃 10 min 后取血。

2.3 血药浓度的高效液相色谱检测 精密称取对照品次乌头碱,以 0.05% 盐酸-甲醇定容,制备高、中、低浓度对照品, -20 °C 冰箱放置。使用前过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜。

血清样品前处理:先用 3 mL 甲醇及 3 mL 水活化 SPE 柱,血清样品上样,6 mL 20% 甲醇冲洗,洗脱液弃去;5% 三乙胺-甲醇 10 mL 冲洗,收集洗脱液,40 °C 水浴加热,旋转蒸发洗脱液至干,0.05% 盐酸-甲醇转移残留物于 2 mL 量瓶中,0.05% 盐酸-甲醇定容,于 -20 °C 冰箱放置,进样前过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜。

色谱分析条件^[8-10]: phenomennex 00F-4435-E0 C18 分析柱($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$);预柱 Dikma RP18 ($4.6 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$);流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温 25 °C。流动相甲醇-水(0.2% 三乙胺,冰醋酸调 pH 10.50)70:30。

标准曲线:将一定量的次乌头碱标准液分别加入 5 份 2 mL 空白血清中,按照样品前处理方法得到对照品溶液。对照品液依次进样。将化合物色谱峰面积对浓度用最小二乘法进行线性回归,得到次乌头碱的回归方程 $Y = 620.22X - 4.6749$, $r = 0.999$,线性范围 $0.0226 \sim 0.181 \mu\text{g}$ 。

精密度试验:取次乌头碱对照溶液,进样 $10.0 \mu\text{L}$,连续进 5 针,依照上述色谱条件进行测定,记录峰面积,次乌头碱 RSD 1.2%。

稳定性试验:取血清样品^[6],在 0, 2, 4, 6, 8 h,



每次进样 10.0 μL,依照上述色谱条件进行测定,记录峰面积,次乌头碱 RSD 2.1%。说明在 8 h 内样品中的次乌头碱比较稳定。

加样回收率:分别将低、中、高浓度对照液 20 μL 加入 3 份 2 mL 空白血清中,同前述样品预处理步骤操作样品,为低、中、高浓度加样回收率样品,各浓度平行制备 5 份。低、中、高浓度组回收率分别为 52.60%, 58.13%, 60.14%, RSD 分别为 1.2%, 0.58%, 0.82%。

2.4 存活率 根据各组小鼠的死亡情况,计算小鼠的存活率。

2.5 数据处理 血药浓度的实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SAS 8.2 处理。两组间均数比较,先进行方差齐性检验。若方差齐,两组间均数比较采用 *t* 检验;若两组总体方差不齐,进行 *t'* 检验。

3 结果

3.1 2 组小鼠血药浓度的动态变化 在灌胃给予附子水煎液 1,7,14 d 后,常态和虚寒状态小鼠血中次乌头碱的浓度变化结果见表 3。与常态组第 1 天相比,常态组第 7 天与第 14 天的血药浓度均显著高于第 1 天 ($P < 0.001$),说明常态小鼠给予附子水煎液后,体内代谢环境发生变化;与常态组第 1 天相比,虚寒状态组第 1 天和第 7 天的血药浓度高于常态组第 1 天 ($P < 0.01$),虚寒状态组第 14 天与常态组第 1 天血药浓度无显著差异,说明虚寒状态的体内代谢环境在给药的过程中也发生变化,由于次乌头碱的半衰期很短,排除蓄积的因素,血药浓度水平间接反应虚寒组给药 14 d 后的体内代谢环境接近于正常组。

表 3 常态和虚寒状态小鼠次乌头碱血药浓度比较

组别	$(\bar{x} \pm s, n = 5)$		
	mg · L ⁻¹		
	给药第 1 天	给药第 7 天	给药第 14 天
正常状态	3.05 ± 0.52	11.53 ± 0.46 ³⁾	7.75 ± 2.08 ³⁾
虚寒状态	4.22 ± 0.66 ¹⁾	4.94 ± 0.69 ²⁾	2.96 ± 0.68 ²⁾

注:与正常状态组比较¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$;与正常状态第 1 天组比较³⁾ $P < 0.001$ 。

3.2 存活率结果 常态和虚寒状态小鼠给予附子水煎液后,给药 1,7,14 d,正常状态小鼠的存活率为 100%, 87.5%, 70.0%, 虚寒状态存活率为 100%, 100%, 92.5%, 虚寒组小鼠的存活率较高。

4 讨论

4.1 常态和虚寒状态小鼠血药浓度的差异提示其机体代谢环境存在差异 前期的实验表明,与常态相比,虚寒小鼠的一般状态和某些生化指标均出现差异:①虚寒状态组动物体毛无光泽变枯萎、竖毛,体重、饮水量和饮食量下降,肛温有下降趋势,反应迟钝、拱背少动、活动量减少;②血浆 17-OHCS 含量下降;血浆 cAMP 含量下降、血浆 cGMP 含量升高、血浆 cAMP/cGMP 下降。而且,与代谢相关的 Cyp3A 活性以及 P-gp 水平在常态和虚寒状态小鼠中也存在差异^[11]。本实验通过比较 2 组小鼠次乌头碱的血药浓度,发现给药第 1 天,2 组血药浓度存在差异;给药多天,2 组血药浓度的变化幅度也有差异。以上结果在一定程度上证实 2 种状态小鼠的代谢环境存在差异。

4.2 多次给药动态观察血药浓度变化提示代谢环境可能被药物干预 实验结果说明,常态和虚寒状态在给药周期 3 个时间点的浓度均发生变化,一定程度说明给予附子水煎液后,机体的代谢环境也在动态变化,初步推测附子水煎液可能改变机体的代谢环境。因此,进一步探讨机体代谢环境变化的影响因素,将为合理用药提供理论基础。

[参考文献]

[1] 刘曦,李飞,张莉. 蜜煮川乌对 H 荷瘤小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 北京中医药大学学报,2004,27(2):68.

[2] Hikoto. Determination of aconitum alkaloids in blood and urine samples II. Capillary liquid chromatographic-frit fast atom bombardment mass spectrometric analysis[J]. J Chromatography B, 1998,(714):215.

[3] 李外,万元浩,刘萍. 中药毒性及合理应用毒性中药[J]. 中国职业药师,2005,11:32.

[4] 王朝虹,文静,陈义华,等. 液相色谱质谱联用测定乌头碱在大鼠体内代谢产物[J]. 中国法医学杂志,2006,21(2):88.

[5] 李端. 血药浓度与给药方案[M]. 上海科学技术出版社,1981:4.

[6] 肖凤霞,周莉玲,李锐,等. 血药浓度法测定四逆汤制剂中乌头生物碱的药动学参数[J]. 广州中医药大学学报,2001,18(3):243.

[7] 王梦德,张述禹,翟海燕. 诃子对草乌煎剂毒动学影响的研究[J]. 内蒙古医学院学报,2002,24(4):219.

[8] 张润生,余琛,刘罡一. 血液中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的 LC/MS/MS 分析[J]. 中国法医学杂志,2004,19(5):165.

[9] 李锐,晏亦林,周莉玲,等. 四逆汤的药动学研究[J]. 中成药,2002,24(10):777.

[10] 李立纪,张风雷,吴荣祖,等. 新法加工川乌与附片抗炎镇痛作用的比较研究[J]. 药物评价,2004,1(2):122.



[11] 白梅荣,张冰,刘小青,等. 常态虚寒状态小鼠 CYP3A 活性

P-gp 水平比较研究[J]. 辽宁中医杂志,2008,35(3):460.

Difference of hyaconitine concentration in serum between cold-deficiency and normal mice

YANG Yuan, HUANG Jianmei, LIU Xiaoqing, BAI Meirong, MA Changhua, ZHANG Bing*
(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the difference of hyaconitine concentration in serum between normal and cold-deficiency mice after administration of aconite decoction. To analyze how the toxic dose of aconite decoction correlate to the metabolic environment. **Method:** Prepared cold-deficiency mice model, treated normal and cold-deficiency mice with aconite decoction for 14 days continuously, and then detected hyaconitine concentration in serum by HPLC along with survival ratio of mice on the first, seventh and fourteenth day. **Result:** After administration of aconite decoction for 14 days, the hyaconitine concentration in serum of cold-deficiency mice is close to that in normal mice. It showed aconite decoction has the ability of regulating metabolism environment, the hyaconitine concentration in serum of normal mice was higher on the seventh and fourteenth day than that on first day. It showed that aconite decoction can disturb metabolism environment of normal mice. It was also been observed that the range of variation of hyaconitine concentration in cold-deficiency mice was minor than that in normal mice during the fourteen days' administration. **Conclusion:** The difference of serum concentration in normal and cold-deficiency mice showed that there were different metabolic environments in two mice models, and the metabolic environment changed during administration. These results showed that the different toxic doses of aconite decoction were partially due to the different metabolic environments.

[Key words] hyaconitine; cold-deficiency; serum concentration; metabolic environment

doi: 10.4268/cjcm20101521

[责任编辑 张宁宁]