

代谢分析

基于经皮给药途径研究白芍对制川乌
6个酯型生物碱组织分布的影响*

杨华生,黎晓丽,闻丽珍,谭丽霞,占珊兰,吴璐**

(江西中医药大学,南昌 330004)

摘要 目的:探讨制川乌配伍白芍经皮给药对制川乌中6个酯型生物碱组织分布的影响。方法:SD大鼠随机分为2组,分别经皮给予制川乌-白芍凝胶及制川乌凝胶,连续5d,末次给药后4、8、20h采集大鼠皮肤、脑、心、肺、肝、脾、肾等组织,以溶剂萃取法对样品进行提取,应用LC-MS/MS方法对组织中6个酯型生物碱乌头碱(AT)、次乌头碱(HT)、新乌头碱(MT)、苯甲酰乌头原碱(BA)、苯甲酰次乌头原碱(BH)、苯甲酰新乌头原碱(BM)的含量进行测定。采用spss统计软件对各组织中药量进行t检验,比较配伍前后6个酯型生物碱在各组织中分布的变化情况。应用主成分分析法(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别法(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)分析配伍对6个酯型生物碱在皮肤及毒靶器官心脏、脑组织中分布的影响。结果:大鼠多次经皮给予制川乌凝胶后,6个酯型生物碱分布较广,主要分布在皮肤,其次为肝、脾、肺、肾,而在脑、心脏组织中的含量较低;配伍后单酯型生物碱苯甲酰新乌头原碱(BM)、苯甲酰乌头原碱(BA)在皮肤组织中的分布显著增加,而3个单酯型生物碱苯甲酰新乌头原碱(BM)、苯甲酰乌头原碱(BA)、苯甲酰次乌头原碱(BH)在心脏和脑组织的分布明显减少;同时双酯型生物碱新乌头碱(MT)、次乌头碱(HT)、乌头碱(AT)在各组织中的分布均呈下降趋势;基于皮肤、心脏、脑组织中6个酯型生物碱的分布规律,利用PCA统计方法可将实验组分为单用组与配伍组;PLS-DA法分析显示,白芍对制川乌中6种酯型生物碱在皮肤、心脏、脑组织中分布的影响由大到小的顺序分别为HT、AT、MT、BM、BH、BA, MT、AT、BA、BH、BM、HT, AT、BH、BA、HT、MT、BM。结论:制川乌配伍白芍经皮给药,可促进部分单酯型生物碱在皮肤中的分布与吸收,同时减少6个酯型生物碱在心脏、脑等毒靶器官的分布,从而发挥“增效减毒”的作用。

关键词: 白芍;川乌;配伍;皮肤给药;组织分布;酯型生物碱;超高效液相色谱-串联质谱;主成分分析;偏最小二乘判别分析

中图分类号:R 917 文献标识码:A 文章编号:0254-1793(2017)06-1029-09

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.06.15

* 国家自然科学基金项目(81360647);江西省教育厅科技计划项目(GJJ150836);江西省卫生与计划生育委员会科技计划项目(20163008)

** 通信作者 Tel:(0791)87118645; E-mail: 1033147985@qq.com

第一作者 Tel:(0791)87118645; E-mail: yanghuasheng456@126.com

Research on the effects of *Paeoniae Radix Alba* on the tissue distribution of six aconite alkaloids in *Aconiti Radix Cocta* based on transdermal administration*

YANG Hua-sheng, LI Xiao-li, WEN Li-zhen, TAN Li-xia, ZHAN Shan-lan, WU Lu**

(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of *Paeoniae Radix Alba* on the tissue distribution of six aconite alkaloids in herb couple of *Aconiti Radix Cocta*-*Paeoniae Radix Alba* after transdermal administration in rats.

Methods: The *Aconiti Radix Cocta* gel and *Aconiti Radix Cocta* combined with *Paeoniae Radix Alba* gel were continuously administered to SD rats of SPF grade for five days, respectively. Tissues of skin, brain, heart, lung, liver, spleen and kidney were collected at 4, 8 and 20 h after transdermal administration. Samples were extracted by ethyl acetate and six aconite alkaloids including aconitine (AT), hyaconitine (HT), meaconitine (MT), benzoyleaconine (BA), benzoylhyaconine (BH), and benzoylmesaconine (BM) in each tissue were determined by LC-MS/MS method. Data were analyzed using SPSS software to compare tissue distribution of six aconite alkaloids based on *t*-test. Principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were used to identify the changes of six aconite alkaloids content in tissues of skin, brain and heart. **Results:** In *Aconiti Radix Cocta* group, the six aconite alkaloids were mainly distributed in skin, followed with liver, spleen, lung and kidney, while low in brain and heart. The distribution of BM and BA in the skin tissue was significantly increased after compatibility, but in the heart and brain tissue, the distribution of 3 kinds of mono ester alkaloids i. e. BM, BA and BH were significantly reduced. At the same time, the contents of the diester-type alkaloids of MT, HT and AT showed a downward trend in every tissue when *Aconiti Radix Cocta* compatibility with *Paeoniae Radix Alba*. Based on the distribution of 6 alkaloids in skin, heart and brain, PCA could directly classify the *Aconiti Radix Cocta* group and compatibility group. The PLS-DA indicated that *Paeoniae Radix Alba* could influence the distribution of 6 alkaloids in skin, heart and brain, and the effect sequences of 6 alkaloids from large to small were as follows: HT, AT, MT, BM, BH, BA; MT, AT, BA, BH, BM, HT; AT, BH, BA, HT, MT, BM, respectively.

Conclusion: The compatibility of *Paeoniae Radix Alba* could decrease the toxicity of *Aconiti Radix Cocta*, and promote the absorption and distribution of partial mono-ester aconite alkaloids at the administration site such as skin, meanwhile, reduce the distribution of the six aconite alkaloids in brain and heart, which was beneficial to lower the toxicity of the *Aconiti Radix Cocta* in central nervous system and cardiovascular system.

Keywords: *Paeoniae Radix Alba*; *Aconiti Radix*; compatibility; transdermal administration; tissue distribution; aconite alkaloids; LC-MS/MS; PCA; PLS-DA

制川乌-白芍药对来源于张仲景著述的《金匱要略》中记载的“乌头汤”，临床上常用来治疗“风湿痹证”。制川乌为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Dex. 的母根，主要含有双酯型生物碱乌头碱 (aconitine, AT)、次乌头碱 (hyaconitine, HT)、新

乌头碱 (meaconitine, MT) 以及毒性较低的单酯型生物碱苯甲酰乌头原碱 (benzoyleaconine, BA)、苯甲酰次乌头原碱 (benzoylhyaconine, BH)、苯甲酰新乌头原碱 (benzoylmesaconine, BM) 6 个酯型生物碱；白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根，

主要含有芍药苷、芍药花苷等。制川乌配伍白芍后不仅能增强制川乌抗炎、镇痛等治疗作用,而且能降低其对心脏、神经等的毒副作用,从而达到“增效减毒”的配伍效果^[1-3]。临床已证实,经皮给药是治疗“风湿痹证”最常用、最有效的给药方式之一,因此,本课题组前期采用微透析技术研究白芍对制川乌经皮给药局部药动学的影响发现,白芍可促进制川乌中部分单酯型生物碱的经皮吸收,抑制双酯型生物碱的经皮渗透^[4]。本文采用经皮给药方式,利用 LC-MS/MS 技术,研究白芍对制川乌中 6 个酯型生物碱组织分布的影响,从组织分布的角度,进一步阐明制川乌白芍配伍的机制。

1 材料

1.1 仪器与试剂

Applied Biosystems (AB) Triple Quad 4500 液质联用仪器 (Applied Biosystems (AB) 公司); Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 50 mm, 2.7 μm; EC-C₁₈; 安捷伦公司); HC-3018R 高速冷冻离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); DW-86L388A 立式超低温保存箱 (青岛海尔特种电器有限公司); XH-C 漩涡混合器 (金坛市医疗仪器厂); QGC-24T 氮气吹干仪 (上海泉岛公司); FA2204B 电子天平 (上海精科天美科学仪器有限公司); 羧甲基纤维素钠 800-1200 (国药集团化学试剂有限公司); 乙腈为色谱纯,水为双蒸水,其他试剂均为分析纯。

1.2 药物与动物

白芍提取物 (每 1 g 提取物相当于白芍 14.81 g; 芍药苷含量为 263.49 mg · g⁻¹)、制川乌提取物 (每 1 g 提取物相当于制川乌 222.22 g; 6 个酯型生物碱含量分别为 BM 23.24, BA 5.13, BH 2.06, MT 6.44, HT 1.78, AT 1.17 mg · g⁻¹) 均为自制^[5]; 对照品芍药苷、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱、乌头碱、氢溴酸高乌甲素 (lappaconite hydrobromide, LHI) (中国食品药品检定研究院,批号分别为 110736-201337、111795-201102、111794-201102、111796-201002、110799-201106、110798-201307、101720-201111、100289-200902); SD 大鼠,体重 (200 ± 20) g,许可证号 SCXK(湘)2011-0003。

2 方法与结果

2.1 分析条件

参照本课题组已发表论文中的色谱和质谱条

件^[4],采用 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 50 mm, 2.7 μm),以 2 mmol · L⁻¹ 乙酸铵溶液 (每 1 000 mL 加 1 mL 甲酸) 为流动相 A,乙腈溶液 (每 1 000 mL 加 1 mL 甲酸) 为流动相 B,梯度洗脱 (0~0.5 min, 25%B → 25%B; 0.5~3 min, 25%B → 70%B; 3~3.5 min, 70%B → 70%B; 3.5~4 min, 70%B → 25%B, 4~6 min, 25%B),流速 0.4 mL · min⁻¹;采用多反应监测模式 (MRM),用于定量分析的离子对分别为 *m/z* 585.3 → *m/z* 535.4 (LHI)、*m/z* 646.4 → *m/z* 586.3 (AT)、*m/z* 632.4 → *m/z* 572.5 (MT)、*m/z* 616.4 → *m/z* 556.4 (HT)、*m/z* 604.5 → *m/z* 554.4 (BA)、*m/z* 590.4 → *m/z* 540.4 (BM)、*m/z* 574.4 → *m/z* 542.4 (BH),其中 LHI 为内标;碰撞诱导解离电压分别为 43 V (LHI)、47 V (AT)、46 V (MT)、47 V (HT)、51 V (BA)、50 V (BM)、48 V (BH)。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取 BM、BA、BH、MT、HT、AT 对照品 20.7、12.7、12.3、11.2、12.6、13.6 mg 置 10 mL 的量瓶中,用异丙醇:三氯甲烷 (1:1) 溶解,并稀释至刻度,配制成浓度分别为 2.07、1.27、1.23、1.12、1.26、1.36 mg · mL⁻¹ 单标储备液;分别精密吸取上述储备液适量,置于 10 mL 量瓶中,加乙腈定容至刻度,制成 6 个酯型生物碱质量浓度均为 10 μg · mL⁻¹ 的混合对照品母液;吸取上述母液适量,加乙腈制备成质量浓度为 0.1、1、2、5、10、50、100、200、500 ng · mL⁻¹ 的系列混合对照品溶液。

2.3 内标溶液的配制

精密称取 LHI 对照品适量,用甲醇配制成 10 μg · mL⁻¹ 的内标母液;精密吸取母液适量,加甲醇制备成 500 ng · mL⁻¹ 的内标溶液,备用。

2.4 凝胶的制备

取羧甲基纤维素钠 1 g,加蒸馏水 19 mL,搅拌溶解,室温放置 24 h,充分溶胀后形成空白凝胶基质。分别称取制川乌 0.19 g 及白芍浸膏 2.85 g (相当于生药比 1:1),空白凝胶基质 6.96 g,搅拌混匀,即得制川乌白芍凝胶;取制川乌浸膏 0.19 g 及空白凝胶基质 9.81 g,搅拌混匀,即得制川乌凝胶。

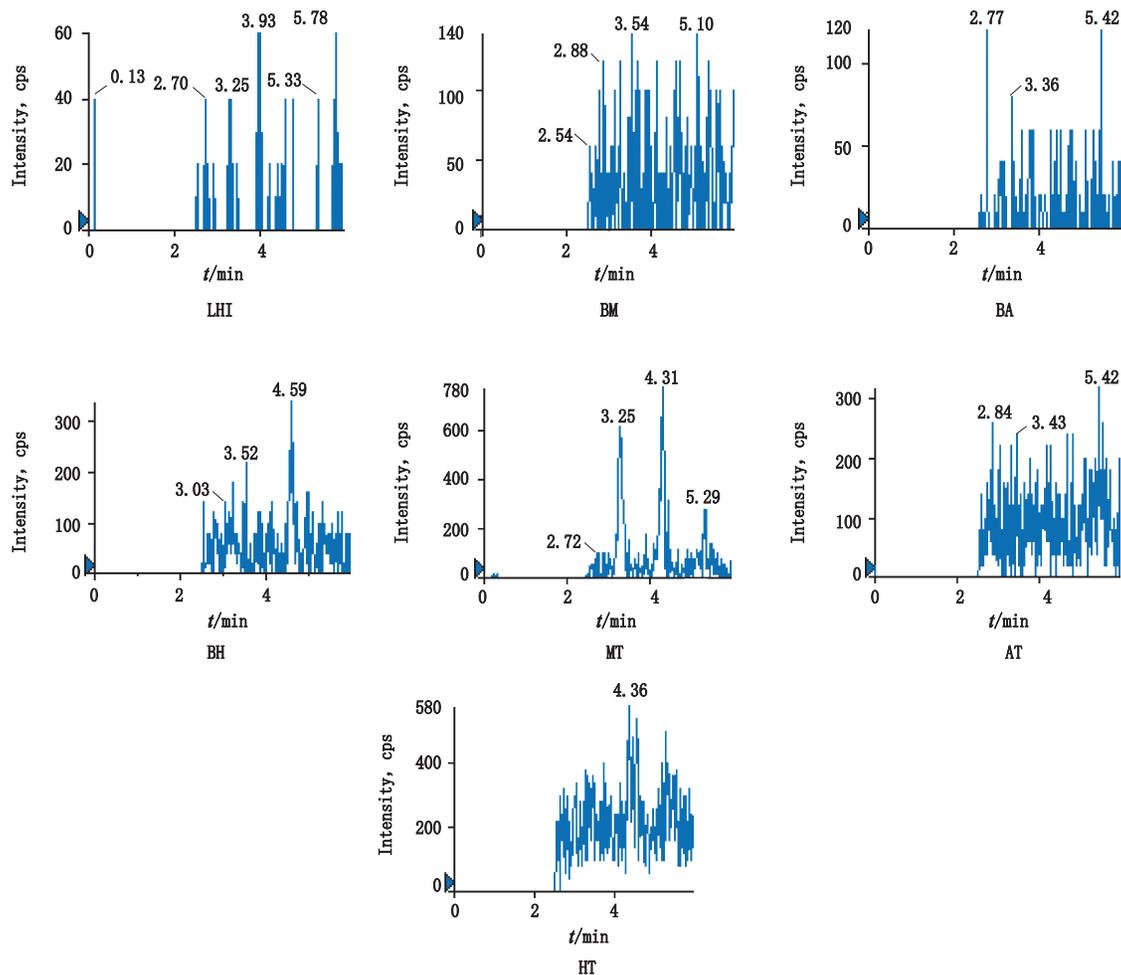
2.5 组织样品的处理^[6-7]

从超低温 (-80 °C) 冰箱取出待测大鼠组织,室温解冻 (<30 °C),用滤纸吸干水分,分别称取心、肝、脾、肺、皮肤、脑组织适量,加 4 倍量生理盐水匀浆,肾组织加 6 倍量生理盐水匀浆,于 4 000 r · min⁻¹,

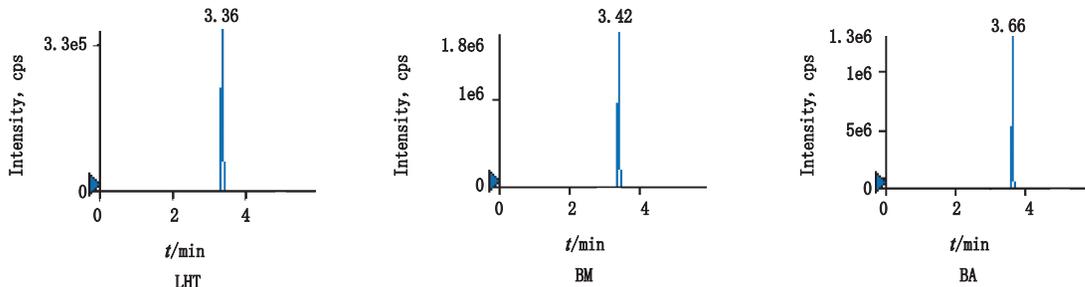
4 °C 离心 10 min, 取上清液, 即为匀浆液, 低温保存, 备用。取匀浆液 200 μL, 加入内标溶液 20 μL, 再加少量 25% 氨水调 pH 至 9~10, 随后加乙酸乙酯 800 μL, 漩涡振荡 2 min, 4 000 r · min⁻¹, 4 °C 离心 10 min, 静置后取上清液, 重复提取 1 次, 合并上清液, 于 28 °C N₂ 气流下吹干, 加入 25 % 乙腈溶液 120 μL, 漩涡 2 min, 12 000 r · min⁻¹, 4 °C 离心 10 min 后, 取上清液待分析。

2.6 方法学考察

2.6.1 专属性考察 取空白组织、空白组织加混合对照品溶液与内标溶液、给药 5 d 后取得的组织样品匀浆液, 按“2.5”项下的方法处理后, 按“2.1”项条件进样分析, 考察是否有内源性物质干扰。结果显示组织中其他成分对 6 个酯型生物碱成分的测定无干扰, 6 个酯型生物碱成分无相互干扰, 峰形良好。以皮肤组织为例, 离子流色谱图见图 1。



A. 皮肤组织空白液 (blank skin tissues)



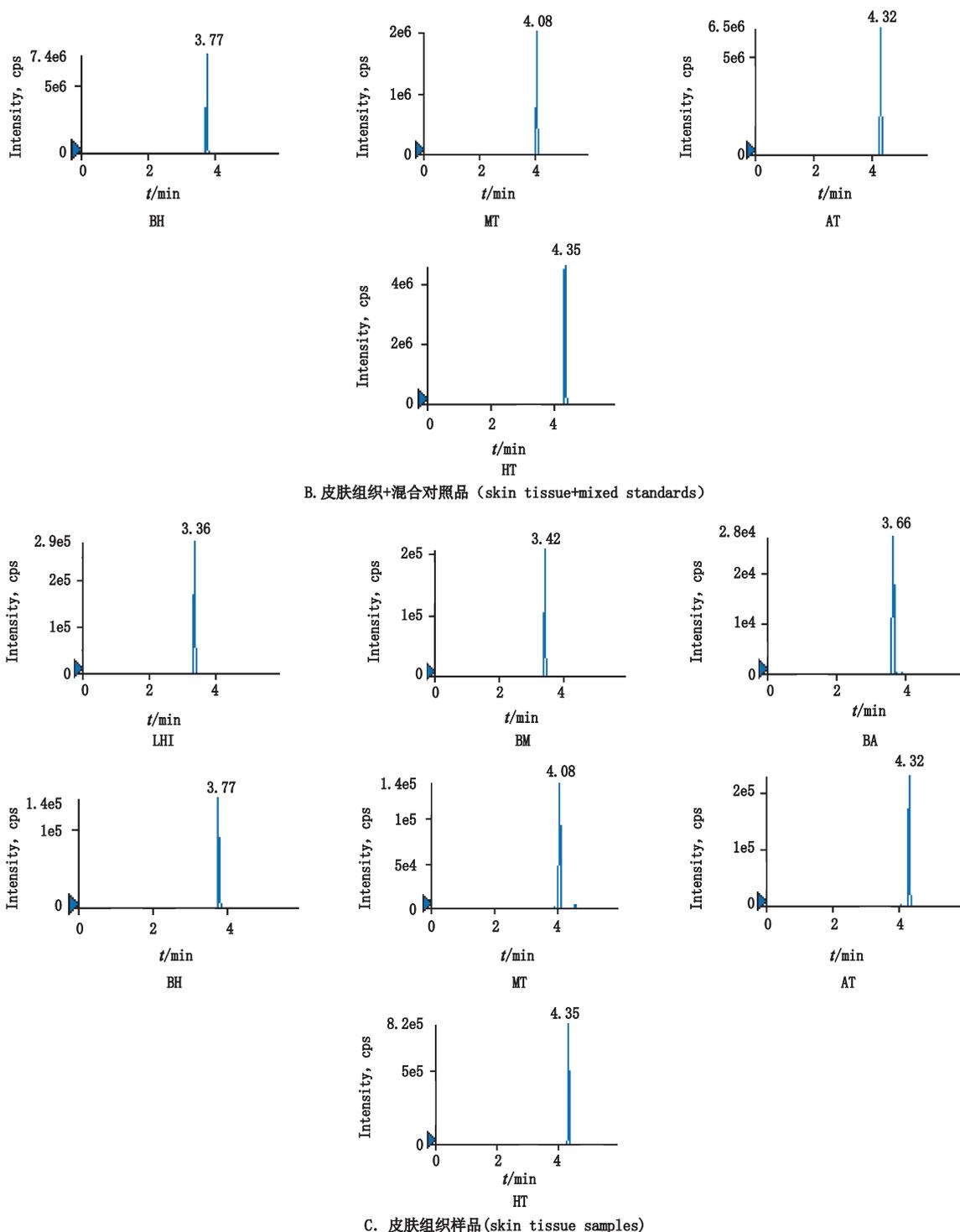


图 1 皮肤离子流色谱图

Fig. 1 Ion current chromatograms of skin tissues

2.6.2 线性关系考察 分别吸取上述系列混合对照品溶液 100 μL 加入到 100 μL 空白组织匀浆液中, 即得质量浓度为 0.05、0.5、1、2.5、5、25、50、100、250 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准组织样品, 按“2.5”项下方法操作, 进样测定。以待测物峰面积与内标峰面积的比值 Y 对

相应的质量浓度 X ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行线性回归, 用加权 ($w=1/x^2$) 最小二乘法进行回归运算, 得各个组织样品标准曲线及回归方程。结果表明, 6 个酯型生物碱在心、肝、脾、肺、肾、脑组织中的线性范围为 0.05~100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 皮肤中的线性范围为 0.05~250 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 线

性关系良好,定量限为 $0.05 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$;取对照品溶液逐级稀释,通过测定峰高和基线噪音,按信噪比 3:1 确定检测限为 $0.01 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.6.3 精密度和准确度考察 配制各组织低、中、高 3 个浓度 (0.5 、 5 、 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的标准组织样品作为质控样品,各浓度平行配制 5 份,按“2.5”项下方法操作,测定批内精密度和准确度。按同样方法连续测定 3 批,计算批间精密度。结果表明,各组织中 6 个酯型生物碱的准确度均在 85%~115% 之间,批内、批间精密度均在 15% 之内,符合生物样品测定要求。

2.6.4 稳定性考察 取各组织低、中、高 3 个浓度 (0.5 、 5 、 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 质控样品,每个浓度平行配制 3 份,分别考察样品于室温放置 24 h、 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存 15 d 和反复冻融 3 次的稳定性。以测定值的平均值与配制的理论浓度(加入值)比较,计算相对误差。结果表明,各组织样品在这 3 种保存条件下稳定性良好。

2.6.5 提取回收率测定 分别取 1、10、 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液 $100 \text{ } \mu\text{L}$,加入内标溶液 $20 \text{ } \mu\text{L}$, $28 \text{ }^\circ\text{C}$ N_2 气流下吹干,加入 25% 乙腈溶液 $120 \text{ } \mu\text{L}$,漩涡 2 min, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min 后,取上清液进样分析,记录 6 个酯型生物碱峰面积,记为 A_1 。再平行制备各组织低、中、高 3 个浓度 (0.5 、 5 、 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 质控样品 5 份,按“2.5”项下方法操作,测定,记录 6 个酯型生物碱峰面积,记为 A_2 。以 $A_2/A_1 \times 100\%$ 的值计算提取回收率。结果表明,各组织中 6 个生物碱的提取回收率的 RSD 均在 15% 以内,符合生物样品测定要求。

2.6.6 基质效应 取 1、10、 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液 $100 \text{ } \mu\text{L}$,加入蒸馏水 $100 \text{ } \mu\text{L}$,再加入内标溶液 $20 \text{ } \mu\text{L}$,按“2.5”项下方法操作,进样测定,记录对照品与内标峰面积比值,记为 A_3 。取空白组织匀浆液 $200 \text{ } \mu\text{L}$,加乙酸乙酯 $800 \text{ } \mu\text{L}$,漩涡振荡 2 min, $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min,静置后取上清液,重复提取 1 次,合并上清液, N_2 气吹干,分别加入 1、10、 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 混合对照品溶液 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 和内标溶液 $20 \text{ } \mu\text{L}$ 复溶,测定,记录对照品与内标峰面积比值,记为 A_4 ;每个浓度平行制备 3 份,以 $A_4/A_3 \times 100\%$ 的值计算基质因子。结果表明不存在明显的基质效应,各组织中 6 个酯型生物碱的基质因子均在 85%~115% 范围内,RSD 均小于 12%。

2.7 体内分布研究

2.7.1 分组及给药 18 只 SD 大鼠,雌雄各半,实验

前 1 d 用推剪除毛。给药前禁食不禁水 12 h,随机分配到制川乌组、制川乌-白芍组,每组 9 只;分别经皮给予上述 2 组药物凝胶 $4.75 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 大鼠^[8](两组凝胶中 6 种酯型生物碱含量相等,分别含 BM 0.442、BA 0.097、BH 0.039、MT 0.122、HT 0.034、AT 0.022 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。每天 1 次,连续经皮给药 5 d,于第 5 天给药后 4、8 h 取相应的大鼠断头处死,迅速取出心、肝、脾、肺、肾、脑、皮肤组织,用生理盐水洗除残余血液,滤纸吸干,称重,装入自封袋中, $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰冻保存备用;凝胶制剂中药物可较长时间匀速或接近匀速释放,组织中药物浓度亦会持续升高,考虑到外用制剂的经皮应用时间,同时为在较短时间内考察药物的消除情况,因此其余大鼠于第 5 天给药后 8 h 后,祛除药物并用蒸馏水洗净给药部位皮肤,再经 12 h 后将大鼠断头处死,同法取出组织,装入自封袋中, $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰冻保存备用。

2.7.2 组织样品测定 制川乌单用经皮给药后,6 个生物碱在大鼠体内分布较广,主要分布在皮肤,其次为肝、脾、肺、肾,而在脑、心脏中的分布量较低;与制川乌组比较,经皮给药 4 h 后,皮肤中单酯型生物碱 BM、BA 的量明显增加 ($P < 0.05$),而双酯型生物碱 MT、AT 和 HT 在给药 4、8 h 后的量均显著减少 ($P < 0.05$),表明制川乌与白芍配伍,可促进部分单酯型生物碱的分布与吸收,而抑制了双酯型生物碱的经皮吸收;6 个生物碱在脑组织亦有分布,但配伍可以改变其分布规律,与单用组比较,经皮给药 4、8、20 h 后,配伍组脑组织中 BA、BH 的量均显著下降 ($P < 0.05$),8 h 后 AT 显著降低 ($P < 0.05$),同时,给药 20 h 后, BM、HT 亦明显减少 ($P < 0.01$),且未检测到 BA 和 BH,表明配伍降低了部分单、双酯型生物碱在脑内分布,这可能与制川乌白芍配伍增加靶器官药物的分布而“增效”,降低在中枢神经等毒靶器官的分布而“减毒”有关;在心脏组织中,给药 4 h 后,配伍组中 3 个单酯型生物碱较制川乌单用组的含量均显著减少 ($P < 0.05$);8、20 h 后,6 个生物碱均明显降低 ($P < 0.05$),同时 20 h 后,在心脏组织中已检测不到 BA、BH、MT 和 AT,这亦与配伍降低心脏毒性存在相关性。在肾脏、肝脏、肺、脾组织中,主要表现为配伍降低了 3 个双酯型生物碱在其中的分布,这可能与配伍降低双酯型生物碱的吸收而导致药物在肾脏、肝脏、肺、脾中分布量下降有关。结果见表 1。

表 1 经皮给药后各时间点 6 个生物碱在大鼠组织中的分布 (n=3)

Tab. 1 Distribution of six aconite alkaloids in different tissues of rat at various time points after transdermal administration

成分 (component)	组织 (tissue)	质量分数 (mass fraction) / (ng · g ⁻¹)					
		4 h		8 h		20 h	
		ZB	Z	ZB	Z	ZB	Z
BM	皮肤 (skin)	590.66 ± 126.43*	217.51 ± 66.35	640.00 ± 92.97	473.28 ± 190.23	80.47 ± 20.88	87.13 ± 21.16
	脑 (brain)	1.80 ± 0.72	5.82 ± 2.92	5.09 ± 1.24	8.90 ± 3.34	0.60 ± 0.07**	2.79 ± 0.30
	心脏 (heart)	5.43 ± 1.77*	35.22 ± 12.17	55.27 ± 30.68*	125.12 ± 18.66	1.16 ± 0.29*	52.06 ± 16.04
	肾脏 (kidney)	114.70 ± 10.57	105.74 ± 7.49	216.20 ± 81.30	230.03 ± 12.00	150.20 ± 72.46	131.73 ± 43.02
	肝脏 (liver)	41.93 ± 4.16	43.92 ± 9.39	100.33 ± 39.79	150.07 ± 32.85	114.87 ± 13.73	120.97 ± 12.43
	肺 (lung)	42.20 ± 21.18	52.17 ± 1.80	64.73 ± 22.08	82.85 ± 7.82	61.80 ± 2.09	61.78 ± 8.24
	脾脏 (spleen)	65.07 ± 15.97	47.57 ± 2.73	175.27 ± 93.33	217.28 ± 1.07	54.67 ± 16.06	66.48 ± 14.95
BA	皮肤 (skin)	101.73 ± 25.25*	47.96 ± 3.67	115.53 ± 27.98	105.77 ± 44.40	18.61 ± 5.07	19.32 ± 3.88
	脑 (brain)	0.12 ± 0.04*	1.57 ± 0.73	0.68 ± 0.17*	2.62 ± 1.15	-**	2.64 ± 0.45
	心脏 (heart)	0.93 ± 0.41**	8.63 ± 2.37	11.69 ± 5.73*	27.95 ± 3.48	-**	10.99 ± 2.43
	肾脏 (kidney)	20.35 ± 1.84	18.49 ± 1.67	45.26 ± 16.56	45.20 ± 2.92	33.93 ± 16.96	27.28 ± 9.19
	肝脏 (liver)	6.97 ± 0.76	8.96 ± 3.00	20.21 ± 10.55	29.42 ± 10.36	18.47 ± 0.99	21.66 ± 2.30
	肺 (lung)	8.41 ± 3.18	9.55 ± 0.68	15.95 ± 5.99	17.28 ± 0.92	12.32 ± 0.74	11.08 ± 1.26
	脾脏 (spleen)	12.09 ± 2.65	9.00 ± 0.86	38.49 ± 20.42	42.24 ± 4.52	11.47 ± 3.82	12.49 ± 2.82
BH	皮肤 (skin)	65.27 ± 13.63	40.46 ± 8.59	77.47 ± 17.51	94.94 ± 44.54	12.90 ± 3.85	14.62 ± 4.01
	脑 (brain)	0.19 ± 0.10*	1.08 ± 0.53	0.66 ± 0.25*	3.45 ± 1.03	-*	0.53 ± 0.25
	心脏 (heart)	0.91 ± 0.34*	7.65 ± 3.65	9.63 ± 4.96*	24.27 ± 3.58	-*	9.94 ± 3.10
	肾脏 (kidney)	29.49 ± 2.79*	20.16 ± 2.84	51.30 ± 13.05	50.81 ± 2.12	36.24 ± 13.85	30.64 ± 4.21
	肝脏 (liver)	7.82 ± 0.71	7.68 ± 0.52	15.38 ± 7.30	23.11 ± 8.22	17.85 ± 1.21	17.24 ± 1.76
	肺 (lung)	8.70 ± 4.14	8.53 ± 0.23	15.61 ± 6.08	18.76 ± 0.07	13.20 ± 0.69*	11.84 ± 0.13
	脾脏 (spleen)	16.87 ± 6.07	9.64 ± 0.93	38.47 ± 13.92	43.21 ± 4.64	13.43 ± 5.45	16.62 ± 0.86
MT	皮肤 (skin)	14.79 ± 0.99*	73.35 ± 16.6	35.47 ± 5.16*	205.08 ± 39.92	36.00 ± 4.70	41.07 ± 6.37
	脑 (brain)	1.23 ± 0.53	1.26 ± 0.59	1.76 ± 0.77	4.20 ± 2.14	0.99 ± 0.12	2.75 ± 1.06
	心脏 (heart)	3.51 ± 0.91	7.07 ± 2.79	7.90 ± 2.66*	17.84 ± 2.30	-*	12.92 ± 3.46
	肾脏 (kidney)	4.71 ± 0.91**	61.36 ± 2.30	39.58 ± 22.96	61.46 ± 6.53	28.59 ± 15.37	54.68 ± 10.86
	肝脏 (liver)	3.92 ± 0.35*	13.34 ± 3.66	14.45 ± 7.41	27.29 ± 6.68	3.15 ± 1.48**	26.32 ± 3.83
	肺 (lung)	9.75 ± 2.70**	30.82 ± 1.44	20.61 ± 12.99	39.00 ± 1.04	16.69 ± 8.08	21.61 ± 3.43
	脾脏 (spleen)	15.48 ± 8.42*	38.75 ± 3.21	52.69 ± 32.79	78.78 ± 5.96	29.15 ± 10.99	42.22 ± 5.55
AT	皮肤 (skin)	7.75 ± 0.45**	39.09 ± 6.97	18.88 ± 4.11**	121.15 ± 22.74	19.11 ± 3.12	21.27 ± 2.48
	脑 (brain)	1.10 ± 0.08	1.20 ± 0.53	0.98 ± 0.46**	2.51 ± 0.17	0.87 ± 0.32	1.15 ± 0.45
	心脏 (heart)	2.42 ± 0.81	4.25 ± 1.96	4.33 ± 1.49**	10.46 ± 1.58	-**	6.85 ± 2.48
	肾脏 (kidney)	2.43 ± 1.33**	34.80 ± 6.23	21.69 ± 11.08	35.89 ± 5.59	19.41 ± 9.18	35.33 ± 1.50
	肝脏 (liver)	2.71 ± 0.34*	7.99 ± 1.86	9.09 ± 4.17	19.18 ± 4.71	2.37 ± 0.38**	17.78 ± 1.79
	肺 (lung)	6.07 ± 1.79**	18.81 ± 1.36	13.21 ± 7.67	22.76 ± 3.17	11.67 ± 4.70	14.35 ± 2.34
	脾脏 (spleen)	9.78 ± 5.39*	21.20 ± 3.60	33.79 ± 19.42	43.44 ± 6.01	19.77 ± 9.64	24.23 ± 2.83
HT	皮肤 (skin)	50.40 ± 3.56**	222.43 ± 41.16	99.67 ± 19.89**	497.00 ± 42.18	103.07 ± 8.33	110.41 ± 11.92
	脑 (brain)	6.01 ± 0.17	10.56 ± 3.04	6.96 ± 1.46	22.90 ± 11.23	4.38 ± 1.01**	12.19 ± 2.18
	心脏 (heart)	12.34 ± 6.48	34.94 ± 12.60	31.73 ± 12.73*	62.39 ± 11.24	1.08 ± 0.38*	51.55 ± 15.63
	肾脏 (kidney)	40.90 ± 9.28**	206.13 ± 24.33	163.30 ± 70.75	211.34 ± 36.89	139.70 ± 65.40	203.85 ± 33.14
	肝脏 (liver)	33.13 ± 1.60**	55.69 ± 7.71	56.53 ± 27.76	100.22 ± 15.22	16.19 ± 1.04**	98.92 ± 6.10
	肺 (lung)	37.80 ± 4.52**	112.08 ± 3.75	84.67 ± 38.94	140.50 ± 27.61	68.60 ± 18.08	90.82 ± 12.72
	脾脏 (spleen)	81.20 ± 32.56	139.85 ± 22.55	220.00 ± 102.23	230.44 ± 17.79	115.60 ± 65.09	167.73 ± 5.87

注 (note): Z—川乌组 (Aconiti Radix Cocta group), ZB—制川乌—白芍组 (Aconiti Radix Cocta—Paeoniae Radix Alba group)。**p*<0.05, ***p*<0.01; “-”表示低于检测限 (below the LOD)

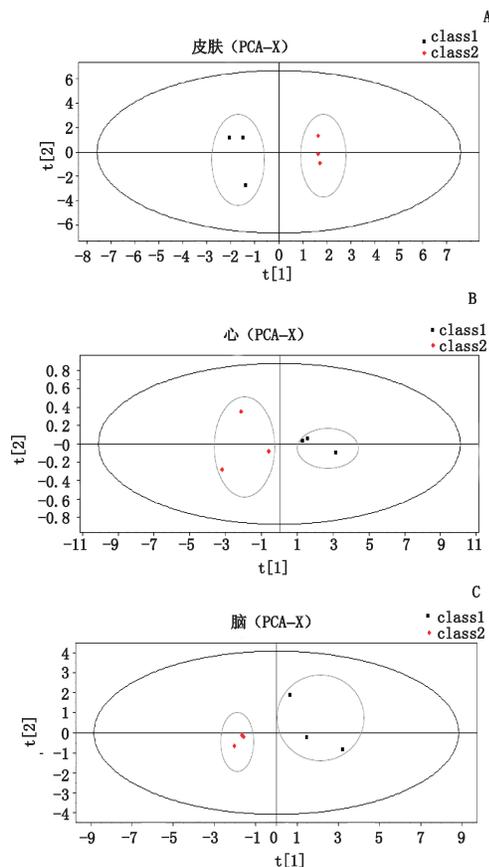
2.7.3 PCA 和 PLS-DA 分析 制川乌经皮给药, 药物在皮肤组织的分布与药物的吸收密切相关, 同时, 制川乌的毒性主要表现为神经、心脏毒性, 因此,

在以上 *t* 检验的基础上, 进一步应用主成分分析法 (principal component analysis, PCA) 和偏最小二乘判别法 (partial least squares discriminant analysis, PLS-

DA)综合分析配伍对6个酯型生物碱在皮肤及毒靶器官心脏、脑组织中分布的影响。本实验给药方案为连续给药5d,于末次给药8h祛除药物,因此在0~20h考察的范围内,8h时组织中的药量为峰值,因此,以皮肤、心脏和脑组织中8h测得的6个生物碱含量为特征变量值,分别进行PCA和PLS-DA分析。由PCA主成分得分图可知,在皮肤、心脏和脑等3个组织中,配伍组与单用组之间的样本点可以完全区分,说明与制川乌组比较,配伍后6个生物碱在皮肤、心脏、脑组织中的分布有显著性差异。从变量重要性图VIP(variable importance plot)可知,皮肤中3个双酯型生物碱HT、AT、MT的VIP均大于1,说明双酯型生物碱对区分配伍组和制川乌单用组的贡献率更大,综合以上t检验结果,进一步表明配伍对双酯型生物碱经皮吸收的抑制效应大于单酯型生物碱促进效应,总体上表现为“减毒”;心脏组织中MT、AT、BA、BH的VIP大于1,同时,在脑组织中AT、BH、BA的VIP大于1,特别是毒性较大的AT在心脏、脑组织中的VIP均较大,以上结果表明配伍不但降低了双酯型生物碱,特别是AT在心脏、脑组织的分布,同时降低了单酯型生物碱的分布,这可能与制川乌配伍白芍降低心脏、中枢神经毒性有关。PCA见图2,VIP见图3。

3 讨论

目前,针对制川乌-白芍药对配伍机制的研究多采用口服等非外用给药途径,而现代生物药剂学研究表明,给药途径是影响药物吸收、分布、代谢、排泄过程的重要因素。药物经皮吸收时,药物透过角质层进入活性表皮,扩散至真皮被毛细血管吸收进入体循环,而口服时药物主要通过小肠微绒毛单层细胞进入血液,再通过门静脉入肝后到达体循环,因此,经皮给药与口服给药在吸收、分布时转运阻力不同,同时皮肤中的药物代谢酶在药物经皮转运时可能使药物发生生物转化,而皮肤中的代谢酶与口服给药所接触的代谢



A. 皮肤 (skin) B. 心脏 (heart) C. 脑 (brain)

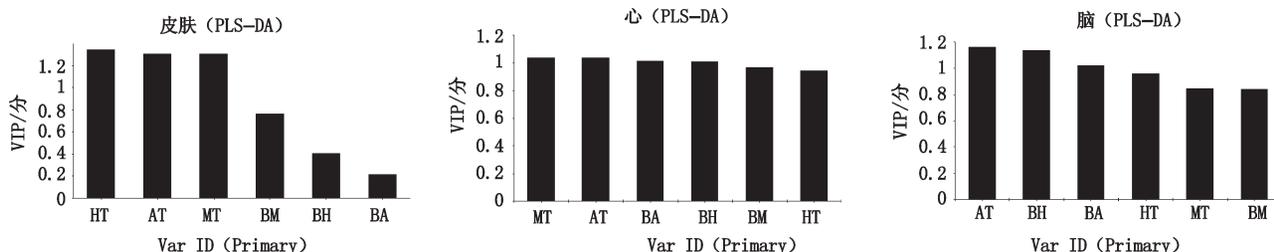
Class 1: 制川乌组 (Aconiti Radix Cocta group) Class 2: 制川乌-白芍药组 (Aconiti Radix Cocta-Paeoniae Radix Alba group)

图2 组织分布PCA图

Fig. 2 PCA plots of distribution in tissues

酶在种类与数量方面均存在较大差异,因此,给药途径不同必然导致药物的体内过程的变化。本文从经皮转运的角度研究制川乌-白芍配伍对6个酯型生物碱的分布的影响,为中药配伍机理研究提供新视角。

本实验研究结果表明,制川乌配伍白芍后促进了单酯型生物碱BM、BA的在皮肤组织的分布,而双酯型生物碱在皮肤组织中的分布量减少,表明制川乌配伍白芍具有“增效减毒”作用,研究结果与本课题



A. 皮肤 (skin) B. 心脏 (heart) C. 脑 (brain)

图3 组织分布VIP图

Fig. 3 VIP plot of distribution in tissues

前期在体微透析研究结果^[4]相一致。白芍对制川乌中单酯型生物碱、双酯型生物碱在皮肤中的分布呈现“促进抑制”相反效应,可能与白芍中芍药苷与单、双酯型生物碱形成“离子对”而导致生物碱的脂溶性发生改变有关^[9]。

制川乌中生物碱既是有效成分又是毒性成分,主要表现为神经、心脏毒性^[10-11]。本实验结果显示,制川乌配伍白芍后降低了生物碱在心脏、脑组织的分布,表明制川乌配伍白芍具有“减毒”作用。文献报道^[15]芍药苷为P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gP)的底物,且能降低维拉帕米对P-gp蛋白的抑制作用。因此,制川乌-白芍配伍可能影响P-gp的活性,从而影响AT等毒性成分在中枢神经系统的分布而起到“减毒”作用。后续研究中,将采用Western Blot、RT-PCR等方法研究配伍对P-gp蛋白的表达,以及MDR1a基因的影响,进一步阐明制川乌-白芍配伍机制。

参考文献

- [1] 李晋奇,彭成. 制川乌配伍白芍的增效作用及其作用机理[J]. 华西药理学杂志, 2007, 22(2): 144
LI JJ, PENG C. The synergistic action and mechanism of the compatibility of Radix Aconiti Preparata and Radix Paeoniae Alba [J]. West China J Pharm Sci, 2007, 22(2): 144
- [2] 李晋奇,王岚,彭成. 川乌配伍白芍的现代临床应用与药理研究浅析[J]. 中医药学刊, 2003, 21(12): 2013
LI JJ, WANG L, PENG C. The analysis of the modern clinical application and pharmacological research of the compatibility of Radix Aconiti preparata and Radix Paeoniae Alba [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2003, 21(12): 2013
- [3] 李晋奇,彭成,姬洁莹. 制川乌总碱与白芍总苷、白芍多糖配伍治疗类风湿性关节炎大鼠的作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22): 2937
LI JJ, PENG C, JI JY. Mechanism study of action on compatible using of total alkaloids of Radix Aconiti Praeparata and total glycosides or polysaccharides of Radix Paeoniae Alba therapy on rheumatoid arthritis in rats [J]. China J Chin Mater Med, 2009, 34(22): 2937
- [4] 黎晓丽,吴璐,吴维刚,等. 在体皮肤微透析法研究制川乌白芍配伍对6种酯型生物碱局部药动学的影响[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(5): 948
LI XL, WU L, WU WG, et al. Effects of combined administration of Paeoniae Radix Alba on local pharmacokinetics of six aconite alkaloids by skin microdialysis *in vivo* [J]. China J Chin Mater Med, 2016, 41(5): 948
- [5] 杨华生,梁秉文,黎晓丽,等. 制川乌配伍白芍对6种乌头生物碱经皮吸收的影响[J]. 中成药, 2015, 37(9): 1917
YANG HS, LIANG BW, LI XL, et al. Percutaneous absorption of six aconite alkaloids due to combining use of prepared aconite and peony [J]. Chin Tradit Pat Med, 2015, 37(9): 1917
- [6] 熊文海,郑琴,胡双,等. 芍药苷对附子的双酯型生物碱体内脏器蓄积的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(18): 1537
XIONG WH, ZHENG Q, HU S, et al. Effect of compatibility with paeoniflorin on the accumulation of diester-typealkaloids of Fuzi in rat's body [J]. Chin Hosp Pharm, 2014, 34(18): 1537
- [7] 张玲非,李向军,王玉峰,等. 白芍总苷在正常大鼠体内的组织分布研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(8): 1040
ZHANG LF, LI XJ, WANG YF, et al. Tissue distribution of total glucosides of paeony in normal rats [J]. Nat Prod Res Dev, 2012, 24(8): 1040
- [8] 王平. 乌头碱经皮给药“量-效-毒”关系探讨[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(4): 53
WANG P. To Investigate the quantity-effect-toxicity relationship of aconitine transdermal drug delivery [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2013, 29(4): 53
- [9] 吴璐,罗永明,梁秉文,等. 制川乌-白芍配伍对芍药苷经皮吸收的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(13): 1
WU L, LUO YM, LIANG BW, et al. Effect of compatibility of Paeoniae Radix Alba and Aconiti Radix Cocta on transdermal permeation role of paeoniflorin [J]. Chin Exp Tradit Med Form, 2015, 21(13): 1
- [10] LIN CC, CHANTY, DENG JF. Clinical features and management of herb-induced aconitine poisoning [J]. Ann Emerg Med, 2004, 43(5): 574
- [11] 刘艳,章诗伟,周兰,等. 乌头类生物碱对心肌的毒性作用及分子毒理学研究进展[J]. 中国法医学杂志, 2009, 24(6): 398
LIU Y, ZHANG SW, ZHOU L, et al. The toxicity of aconitum alkaloids on cardiocytes and the progress of its research using the methods of molecular toxicology [J]. Chin J Forensic Med, 2009, 24(6): 398
- [12] 张小龙,吴先富,王昆,等. HPLC-QTOF-MS法测定风湿骨痛胶囊中9个乌头类生物碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(3): 414
ZHANG XL, WU XF, WANG K, et al. Determination of 9 aconitum alkaloids in Fengshi Gutong capsules by HPLC-QTOF-MS [J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(3): 414
- [13] 崔萍,杨莉,熊爱珍,等. UPLC-MS法测定消肿片中3个乌头碱类双酯型生物碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(5): 868
CUI P, YANG L, XIONG AZ, et al. Quantification of three aconitine-type diester alkaloids in Xiaozhong tablets by UPLC-MS [J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(5): 868
- [14] 黄志芳,易进海,陈东安,等. 制川乌 HPLC 特征图谱研究和6种酯型生物碱的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(2): 217
HUANG ZF, YI JH, CHEN DA, et al. HPLC specific chromatogram of Radix Aconiti Praeparata and determination of six esteric alkaloids [J]. Chin J Pharm Anal, 2011, 31(2): 217
- [15] CHAN K, LIU ZQ, JIANG ZH, et al. The effects of sinomenine on intestinal absorption of paeoniflorin by the everted rat gut sac model [J]. J Ethnopharmacol, 2006, 103(3): 425

(本文于2016年6月25日收到)