

大鼠舌下静脉给药华蟾毒配基的药动学研究

张磊¹, 齐刚², 张莉³, 高艳荣³, 柯峥³, 熊小军³

(1. 武警医学院附属医院 药剂科, 天津 300162; 2. 武警医学院 中心实验室, 天津 300162;

3. 武警医学院 药剂学教研室, 天津 300162)

摘要:目的 建立华蟾毒配基在大鼠体内的血药浓度的 HPLC 测定方法, 并根据血药浓度-时间数据计算其体内药动学参数。方法 经舌下静脉分别注射 0.251、0.503、1.006 mg/kg 华蟾毒配基, 采用 RP-HPLC 法测定血清中药物浓度, 用 3P87 药动学软件计算药动学参数。结果 华蟾毒配基在大鼠体内的动力学过程可用一级动力学过程的二室开放型模型来描述。高、中、低 3 个不同剂量组的主要药动学参数分别为: $t_{1/2\alpha}$: 0.483 0、0.377 7、0.272 3 h; $t_{1/2\beta}$: 4.418 9、5.897 2、2.468 2 h; $V_{(c)}$: 2.512 0、8.660 6、27.937 8 L/kg; AUC: 12.197 0、8.412 3、2.905 6 $\mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{mL})$; CL: 2.049 7、5.943 7、34.416 6 L/(kg · h)。结论 本研究建立的 RP-HPLC 测定大鼠静脉注射不同剂量华蟾毒配基后血药浓度的实验方法简便、快速、灵敏, 血清中内源性物质不干扰测定, 可为华蟾毒配基临床安全合理用药和制剂质量控制提供依据。

关键词: 华蟾毒配基; 血药浓度; 药动学; 高效液相色谱

中图分类号: R285.61; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2007)02-0199-04

Pharmacokinetic studies of cinobufagin after sublingual iv administration in rats

ZHANG Lei¹, QI Gang², ZHANG Li³, GAO Yan-rong³, KE Zheng³, XIONG Xiao-jun³

(1. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Forces,

Tianjin 300162, China; 2. Central Laboratory, Medical College of Chinese People's Armed

Police Forces, Tianjin 300162, China; 3. Department of Pharmacy, Medical College

of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

Abstract: Objective To develop a RP-HPLC method for determination of cinobufagin in rat serum and to calculate the pharmacokinetic parameters of cinobufagin through blood concentration-time curve.

Methods The pharmacokinetics of cinobufagin was investigated in rats after sublingual iv administration of cinobufagin in 0.251, 0.503, and 1.006 mg/kg. Serum concentrations of cinobufagin were determined by HPLC. 3P87 Pharmacokinetic program was used to describe the compartment-mode of the blood concentration-time curve of cinobufagin and to calculate the main pharmacokinetic parameters. **Results**

The blood concentration-time curves of cinobufagin following single iv administration in rats *in vivo* conformed to two compartment open model in one grade pharmacokinetics. The major pharmacokinetic parameters of cinobufagin (1, 0.5, and 0.25 mg/kg) were $t_{1/2\alpha}$: 0.483 0, 0.377 7, 0.272 3 h; $t_{1/2\beta}$: 4.418 9, 5.897 2, 2.468 2 h; $V_{(c)}$: 2.512 0, 8.660 6, 27.937 8 L/kg; AUC: 12.197 0, 8.412 3, 2.905 6 $\mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{mL})$; CL: 2.049 7, 5.943 7, 34.416 6 L/(kg · h). **Conclusion** RP-HPLC Method is simple, rapid, sensitive, and accurate for determination of cinobufagin without any interference by endogenous substances in rat serum, which can be provided with academic foundation for clinical application and quality control of cinobufagin.

Key words: cinobufagin; blood concentration; pharmacokinetics; HPLC

蟾酥为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *B. melanostictus* Schneider 的耳后腺及皮肤腺分泌的白色浆液, 经加工干燥制成。蟾酥化学成分主要有蟾蜍毒素类、蟾毒配基类、蟾毒色胺类以及吗啡等。华蟾毒配基是蟾酥

中主要的化学成分之一, 具有较高的药理活性, 可以调节患者的细胞和体液免疫功能, 防止乙肝慢性病变和癌变, 在临床上已广泛应用于肿瘤治疗, 尤其是对原发性肝癌、肺癌、食管癌和胃癌有较好的疗效, 在与化放疗药物合用时, 起到增效减毒的作用。但是

收稿日期: 2006-04-10

作者简介: 张磊(1973—), 男, 天津人, 武警医学院附属医院药剂科主管药师, 1996年毕业于天津医科大学, 2003年获河北医科大学药理学硕士学位, 主要从事临床药理学研究工作。

华蟾毒配基治疗病毒性肝炎时不良反应发生率高达 43.28%^[1~6]。本实验建立了华蟾毒配基血药浓度的 HPLC 测定法,对其在大鼠体内的药动学过程进行了研究^[6~10]。

1 材料与仪器

华蟾毒配基对照品(中国药品生物制品检定所,批号:803-9202)。色谱纯甲醇,分析纯无水乙醚、醋酸乙酯、无水乙醇。

雄性 Wistar 大鼠,体重 220±25 g,天津市实验动物中心提供,实验前正常饲养 2 周。

日本岛津 LC-10A 高效液相色谱仪(LC-10AT_{VP} 高压泵,CTO-10AS_{VP} 柱箱,SPD-10A_{VP} UV 检测器,CR-8A 积分仪);Milli-Q1aBo 小型纯水机(美国 Millipore 公司);LC-P45 分析天平(瑞士 Mettler 公司);HZS-H 水浴振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);XW-80A 型旋涡混合器(上海琪特分析仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 血清中华蟾毒配基 HPLC 测定方法的建立

2.1.1 色谱条件:Shim-pack VP-ODS 色谱柱(150 mm×4.6 mm,5μm);流动相为甲醇-水(70:30);体积流量:1.0 mL/min;检测波长:290 nm,柱温:30℃;进样量:20 μL。

2.1.2 对照品溶液和内标溶液的制备:分别精密称量华蟾毒配基对照品 4.0 mg 和对羟基苯甲酸乙酯 10.0 mg,用少量甲醇溶解后,加甲醇定容至 100 mL,得质量浓度为 40 μg/mL 对照品储备液和 100 μg/mL 内标液,4℃冰箱内保存备用。

2.1.3 标准曲线的制备:取 20 μL 内标溶液和不同量的华蟾毒配基对照品溶液 100 μL 置于尖底离心试管中,挥干溶剂后加入空白大鼠血清 1 mL,共 6 份,使血清中华蟾毒配基的质量浓度分别为 0.25、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 μg/mL。按照血清样品的处理项下操作,以样品峰与内标峰面积比对应的质量浓度作线性回归,得标准曲线回归方程为 $Y = 0.09072 + 0.348C$, $r = 0.9978$,结果华蟾毒配基在 0.25~4 μg/mL 线性关系良好。

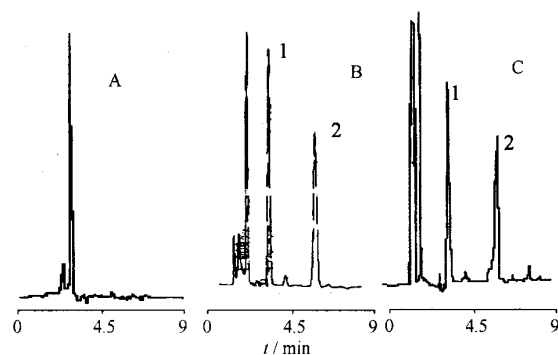
2.1.4 给药方法与样品采集:成年雄性 Wistar 大鼠 105 只,随机分为 3 组,即华蟾毒配基低、中、高 3 个剂量组,每组 35 只。大鼠实验前 12 h 开始禁食,但不禁水。根据动物和人体表面积比例换算出大鼠给药量为每 100 g 体重给药 1 mL,设定低剂量为临床等效剂量。低、中、高剂量之比为 1:2:4。按照动物分组,给各组大鼠舌下 iv 分别给药 25、17、50、30、

100.66 μg/mL 华蟾毒配基溶液。各试验组分别在舌下 iv 给药后的 30、60、90、120、180、240、360 min 取 5 只大鼠断头取血。血液静置 1 h 后,3 000 r/min 离心 20 min,分离提取血清,冻存备用。

2.1.5 血清样品的处理:离心试管中加入 100 μg/mL 对羟基苯甲酸乙酯甲醇溶液内标液 20 μL,挥干溶剂后,加入大鼠血清 1 000 μL,旋涡混合器上间断振荡 3 min,加入 4 mL 提取液无水乙醚-醋酸乙酯(5:1),旋涡混合器上间断振荡 3 min,2 000 r/min 离心 2 min,冰箱冻存(控制冻存时间一致),倾出上清液。同法再提取 1 次,合并上清液,置于水浴摇床上(40℃,50 r/min)挥干溶剂。加入 250 μL 色谱纯甲醇,旋涡混合器上间断混合 2 min,滤过,得滤液。

2.1.6 最低检出量和最低检出质量浓度:取 4 份质量浓度为 40 μg/mL 华蟾毒配基对照品溶液 10 μL,分别用甲醇定容为 1、2、5、10 mL,进样 20 μL,结果均能清晰测出华蟾毒配基的色谱峰,故最低检出量为 1 ng,最低检出质量浓度为 0.05 μg/mL(信噪比为 3.5)。

2.1.7 方法的专属性:在本实验色谱条件下,华蟾毒配基与血清中杂质峰及内标峰达到良好分离,完全可以满足定量的要求。华蟾毒配基和内标的保留时间分别为 6.1 min 和 3.2 min,色谱图见图 1。



A-空白血清 B-加样空白血清 C-iv 给药后血清

1-内标 2-华蟾毒配基

A-blank serum, B-blank serum spiked with cinobufagin

C-serum sample after iv administration

1-internal standard 2-cinobufagin

图 1 大鼠血清中华蟾毒配基的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of cinobufagin in rat serum

2.1.8 回收率试验:取内标液 20 μL,加入 0.25、1.0、4.0 μg/mL 华蟾毒配基对照品溶液 20 μL,吹干,加入 1 mL 空白血清,混匀,处理后,进样 20 μL,将峰面积值代入标准曲线方程,计算华蟾毒配基质量浓度,以测

定值与理论值之比计算回收率,结果 3 种质量浓度的平均回收率分别为 100.10%、99.87%、99.81%,RSD 分别为 2.16%、1.84%、1.93%($n=5$)。

2.1.9 精密度试验:取 3 个剂量华蟾毒配基血清样品,处理后,于 1 d 内重复测定及连续 6 d 内测定 6 次,计算日内及日间精密度,结果 RSD 均小于 5%。

2.2 数据分析:血药浓度-时间数据采用中国药理学学会数学药理专业委员会的 3P87 实用药动学计算程序软件进行拟合。

2.3 华蟾毒配基在大鼠体内的药时过程:大鼠 iv 不同剂量华蟾毒配基后,不同时间的华蟾毒配基的血药浓度测定结果见表 1。不同用药剂量的华蟾毒配基平均血药浓度 $C-t$ 曲线见图 2。

表 1 大鼠 iv 给药后血药浓度($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Blood concentration of rat after iv cinobufagin ($\bar{x} \pm s, n=5$)

t/min	0.251 mg/kg	0.503 mg/kg	1.006 mg/kg
30	1.269 $\pm$ 0.43	2.563 $\pm$ 0.56	5.436 $\pm$ 1.49
60	0.618 $\pm$ 0.26	1.483 $\pm$ 0.34	2.749 $\pm$ 1.33
90	0.366 $\pm$ 0.22	1.000 $\pm$ 0.36	1.803 $\pm$ 0.35
120	0.284 $\pm$ 0.13	0.555 $\pm$ 0.15	1.313 $\pm$ 0.26
180	0.216 $\pm$ 0.14	0.507 $\pm$ 0.11	0.636 $\pm$ 0.28
240	0.151 $\pm$ 0.08	0.468 $\pm$ 0.18	0.566 $\pm$ 0.18
360	测不出数据	0.313 $\pm$ 0.11	0.359 $\pm$ 0.12

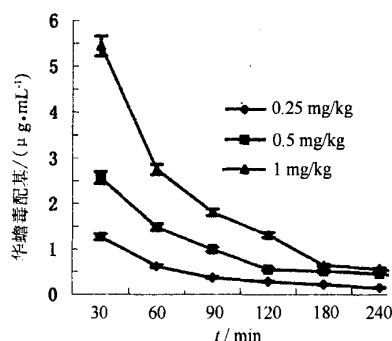


图 2 iv 给药后华蟾毒配基在大鼠体内的平均血药浓度-时间曲线

Fig. 2 Mean blood concentration-time curve of rats after iv cinobufagin in vivo

2.4 华蟾毒配基在大鼠体内的药动学参数:将低、中、高不同剂量组华蟾毒配基在大鼠体内的血药浓度-时间数据输入 3P87 药代动力学计算程序处理,分别用一室、二室模型拟合药时曲线。将两种模型的处理结果进行比较,选择其中残差平方和(SUM)值最小、拟合度(r^2)最佳、AIC 值最小者定为所测药物的最佳室型。结果华蟾毒配基在大鼠体内的药动学过程符合二室模型。华蟾毒配基在大鼠体内药动学

参数见表 2。

表 2 大鼠 iv 给药后华蟾毒配基的药动学参数($n=5$)

Table 2 Pharmacokinetic parameters of rats after iv cinobufagin ($n=5$)

参 数	0.25 mg/kg	0.5 mg/kg	1.0 mg/kg
A/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	3.110 0	5.111 3	9.025 6
α/h	2.545 3	1.838 3	1.435 2
B/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.469 4	0.662 0	0.926 7
β/hr	0.278 8	0.117 5	0.156 9
V(c)/(L · kg ⁻¹)	27.937 8	8.660 6	2.512 0
$t_{1/2\alpha}/\text{h}$	0.272 3	0.377 7	0.483 0
$t_{1/2\beta}/\text{h}$	2.486 2	5.897 2	4.418 9
K_{21}/h	0.576 2	0.314 8	0.275 9
K_{10}/h	1.231 9	0.686 3	0.816 0
K_{12}/h	1.016 2	0.950 6	0.500 2
AUC/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	2.905 6	8.412 3	12.197 0
CL/(L · kg ⁻¹ · h ⁻¹)	34.416 6	5.943 7	2.049 7

3 讨论

3.1 给药方法的选择:在预试验中,对 3 组大鼠分别采用口服、腹腔注射、舌下静脉 3 种给药方法。结果发现,口服给药所需剂量大,且有肝脏首过效应,药品起效相对慢,实验结果个体差异较大。而腹腔给药,由于在腹腔给药部位和深浅的不同,极易造成局部血药浓度过高,导致在检测时得出错误的结论。相对而言,舌下静脉给药,药物直接入血,干扰因素较少,数据更为可靠。

3.2 取血方法的选择:选择断头取血法,因为该法处死动物迅速,可马上摘取组织,保证取样时间的准确性。

3.3 提取条件的选择:加入提取液乙醚-醋酸乙酯(5:1)4 mL,旋涡混合器上间断振荡混合 3 min,可以保证让血清中药物充分提取且又不致因振荡时间过长使匀浆液乳化。本方法提取率可达到 100%。

3.4 本研究建立的 HPLC 法测定大鼠静脉注射华蟾毒配基后血药浓度的实验方法,操作简便、结果可靠,仪器较为普及,方法专属性好,回收率、精密度和重现性均较好。血浆中的内源性物质不干扰华蟾毒配基的测定,为临床监测华蟾毒配基血药浓度提供了可借鉴的方法。药动学参数显示大鼠单次静脉注射华蟾毒配基后,血浆药-时曲线符合二室开放模型。血药浓度下降迅速,体内分布快,消除也较快。提示在临床用药中应考虑缩短给药间隔,且有必要对华蟾毒配基进行剂型方面的改进,如研究其缓释剂型,延长药物作用时间。

References:

- [1] Cheng G. The advances in quality determination, pharmacological studies and clinical application of toad venom [J].

- Chin Tradit Herb Drugs*. (中草药), 2001, 32(2): 184-186.
- [2] Qu C H. Pharmacology and clinical uses of cinobufagin injection [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 1999, 10(5): 382-383.
- [3] Zhu W W. Study on quality standards for Chansu Injection [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1999, 21(2): 63-65.
- [4] Su Y H, Yin X C, Xie J M, et al. Inhibition effects of three kinds of bufotoxins on human SMMC-7721 and BEL-7402 hepatoma cells lines [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2003, 24(4): 393-395.
- [5] Gao Y R, Zhang L, Zhang L, et al. Progress on pharmacology and mechanism of Chansu with the active components [J]. *Acta Acad Med CPAPF* (武警医学院学报), 2003, 12(5): 406-408.
- [6] Zhang M. The optimum extraction technology of *Venenum bufonis* in venenum bufonis analgesic plaster [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2003, 14, (12): 744-745.
- [7] Su Y H, Huang X Q, Zhang D Z, et al. HPLC Separation and determination of bufadienolide in cinobu-facini injection [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2003, 25(1): 24-27.
- [8] Peng J, Guo X M, Zhou Y R, et al. Determination of bufogenin in Liushen Pills by RP-HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析), 1996, 16(2): 117-118.
- [9] Jiang W J, Peng Y Z, Xu R L. Determination of cinobufagin and resibufogenin in Shexiangbaixin Pill by HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2002, 24(12): 924-926.
- [10] Zhang L, Bai X, Qi G, et al. RP-HPLC Determination of bufalin in rat serum [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析), 2004, 24(5): 523-525.

纳米化对三七中有效成分溶出的影响

苏艳丽¹, 傅正义^{1*}, 马培艳^{1,2}, 马晶晶¹, 王为民¹

(1. 武汉理工大学 材料复合新技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430070; 2. 武汉理工大学理学院, 湖北 武汉 430070)

摘要:目的 研究三七纳米化前后显微结构及其有效成分的变化。方法 采用高速离心剪切式超细粉碎仪对三七进行纳米化粉碎,通过光散射粒度分析仪进行粒度分析、扫描电镜、透射电镜观察其显微结构,采用 HPLC 法测定了纳米化对人参皂苷 Rb₁ 的影响。结果 随着主轴转速的增大和粉碎时间的延长,三七粉碎颗粒尺寸呈逐渐减小趋势,在主轴转速 1 500 r/min,固体比例 5.5%,粉碎时间 50 min 时,三七颗粒平均尺寸达到 133.5 nm;三七纳米化后人参皂苷 Rb₁ 的溶出率有较大提高,与原粉相比提高了 59.7%。结论 高速离心剪切式超细粉碎仪可以对根茎类中药进行超细粉碎,纳米化后可促进中药有效成分的溶出。

关键词:三七; 纳米粉碎; 人参皂苷 Rb₁; 高效液相色谱

中图分类号: R284.2; R286.06

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)02-0202-03

Effect of nano-grinding on dissolving-out ratio of active constituents from *Panax notoginseng*

SU Yan-li¹, FU Zheng-yi¹, MA Pei-yan^{1,2}, MA Jing-jing¹, WANG Wei-min¹

(1. State Key Laboratory of Advanced Technology for Materials Synthesis and Processing, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China; 2. School of Science, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China)

Key words: *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen; nano-grinding; ginsenoside Rb₁; HPLC

三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根,具有活血化瘀、散瘀定痛等功效,用于治疗心血管疾病。中药产生的药理效应不能唯一地归功于该药特有的化学组成,还与药物的物理状态密切相关。当颗粒尺寸小到一定程度时,药效可能会发生突变。据此提出了纳米中药的概念。目前,获得纳米中药的方法为高能球磨法^[1~4]和超音速射流喷雾干燥法^[5,6]。本实验采用高速离心剪切技术研究了三七纳米化,并观察了粉碎前后三

七颗粒显微结构的变化,采用 HPLC 法考察了三七纳米化对其有效成分人参皂苷 Rb₁ 的影响。

1 仪器与试剂

Micros-0 高速离心剪切式超细粉碎仪(日本奈良机械制作所); Zeta PALS 光散射粒度分析仪(美国 Brookhaven 公司); JSM-5610LV 型扫描电子显微镜、JEM-2000FX II 分析型透射电镜(日本电子株式会社); Agilent 1110 高效液相色谱仪(美国 Agilent 科技公司)。

收稿日期: 2006-04-29

基金项目: 国家自然科学基金资助(50272047, 50220106657)

作者简介: 苏艳丽(1979—), 女, 湖北荆州人, 博士, 主要从事中药纳米化的研究。 Tel: (027)87865484 E-mail: susiay@sohu.com

* 通讯作者 傅正义 Tel: (027)87865484 E-mail: zyfu@public.wh.hb.cn