

华蟾蜍毒素在大鼠体内的组织分布研究

张磊¹, 张莉^{2*}, 白雪², 齐刚²

(1. 武警医学院附属医院 药剂科, 天津 300162; 2. 武警医学院 药剂学教研室, 天津 300162)

摘要:目的 研究华蟾蜍毒素在大鼠体内的组织分布特征, 为临床合理用药提供依据。方法 大鼠舌下 iv 0.5、1 mg/kg 华蟾蜍毒素。采用 HPLC 法测定大鼠组织中不同时间点的药物浓度, 组织生物样品用液-液萃取法处理。结果 大鼠舌下 iv 华蟾蜍毒素后, 组织分布较快, 给药后 30 min, 除脂肪外其余 8 个组织均可测到华蟾蜍毒素; 给药后 60 min, 大部分血流丰富组织即达到药物浓度峰值, 其中肝脏药物浓度最高; 当给药浓度成倍增加时, 华蟾蜍毒素在各组织中的达峰时间并没有变化, 只是相应时间点的药物浓度均略有升高, 药物消除的时间也相应延长。结论 华蟾蜍毒素在大鼠组织中分布广泛, 吸收和消除均较快, 在脑组织中也可达到较高药物浓度。

关键词: 华蟾蜍毒素; 高效液相色谱; 组织分布

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)05-0722-04

Tissue distribution of cinobufagin in vivo in rats

ZHANG Lei¹, ZHANG Li², BAI Xue², QI Gang²

(1. Department of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China; 2. Department of Pharmacy, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

Abstract: **Objective** To investigate the tissue distribution character of cinobufagin in *in vivo* in rats, in order to provide some references for rational drug use in the clinic. **Methods** Two kinds of solutions of cinobufagin were given to rats (0.5 and 1 mg/kg) by sublingual iv injection. The cinobufagin concentration in rat tissues corresponding to different time-point was determined by HPLC. The biological samples of the different tissues were performed by liquid-liquid extraction method. **Results** Cinobufagin distributed rapidly to tissue after sublingual iv injection. At 30 min cinobufagin in eight tissues except fat was detected. At 60 min the concentration in a majority of tissue achieved the peak value and liver's was tiptop. When the concentration of cinobufagin increased by gemination, the time of reaching peak value had no change. Only the concentration of cinobufagin increased slightly corresponding to the time-point. **Conclusion** The distribution of cinobufagin in tissues of rats is extensive. Both the absorption and elimination of cinobufagin are quick and up to the top concentration in brain tissue.

Key words: cinobufagin; HPLC; distribution of tissue

华蟾蜍毒素是蟾酥的提取物, 具有较强的药理活性, 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, 而价格比干扰素等抗病毒药物低得多。在临床上也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。但是临床用于治疗病毒性肝炎时发现其不良反应发生率高达 43.28%^[1,2]。笔者经反复探索建立了血液中华蟾蜍毒素的高效液相色谱测定方法, 采用舌下静脉 iv 的给药方式, 研究两个不同剂量下华蟾蜍毒素在大鼠体内的药动学过程^[3,4]。为进一步

指导临床合理用药, 本实验又进行了两个剂量华蟾蜍毒素在大鼠体内的组织分布研究。

1 材料与仪器

雄性 Wistar 大鼠, 体质量 (220 ± 15) g, 购自军事医学科学院实验动物中心, 合格证号为 SCXK-(军)2002-001, 实验前, 正常饲养 2 周。

华蟾蜍毒素对照品由中国药品生物制品检定所提供, 批号: 803-9202; 对羟基苯甲酸乙酯对照品由中国药品生物制品检定所提供, 批号: 803-9202; 色谱纯甲醇, 其他试剂均为分析纯, 由天津市康科德科

* 收稿日期: 2008-08-04

基金项目: 武警医学院青年基金资助项目 (WYQ2006-13)

作者简介: 张磊 (1973—), 男, 天津人, 主管药师, 2003 年获河北医科大学药理学硕士学位, 从事天然药物药动学及医院制剂研究。

Tel: (022) 60577684 E-mail: zhanglei458@sohu.com

* 通讯作者 张莉 Tel: (022) 60578196 E-mail: zhli62tianjin@yahoo.com.cn

技有限公司提供;超纯水。

Shimadzu 高效液相色谱仪 (Shimadzu LC - 10A TVP 高压泵, Shimadzu CTO - 10ASVP 柱箱, SPD - 10AVP UV 检测器, Shimadzu C - R8A 积分仪)。LC - P45 百万分之一天平 (Mettler); AE100 万分之一天平 (上海); 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 色谱条件: Shim-pack VP-ODS 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (70 : 30); 体积流量: 1 mL/min; 检测波长: 290 nm; 柱箱温度: 30 °C; 进样量: 20 μL。在本研究的液相色谱条件下, 华蟾蜍毒素的最低检出质量浓度为 0.14 μg/mL。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的配制: 精密称取华蟾蜍毒素对照品 10.066 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释至刻度, 得华蟾蜍毒素对照贮备液 (100.66 μg/mL)。避光 4 °C 冰箱保存。临用时将贮备液用流动相稀释至所需浓度。

2.2.2 内标液的配制: 精密称取对羟基苯甲酸乙酯对照品 10.010 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释至刻度, 得对羟基苯甲酸乙酯内标贮备液 (100 μg/mL), 避光 4 °C 冰箱保存。

2.3 方法学确证

2.3.1 标准曲线的制备: 取 100 μg/mL 对羟基苯甲酸乙酯内标溶液 20 μL 和适量华蟾蜍毒素对照品溶液置于尖底离心试管中, 挥干溶剂后加入空白组织匀浆液 1 mL, 共 5 份, 使空白组织匀浆液中华蟾蜍毒素的质量浓度分别为 0.25、0.5、1.0、2.0、3.0 μg/mL。离心试管中加入 4 mL 提取液乙醚-醋酸乙酯 (5 : 1), 旋涡混合器上间断提取 3 min, 2 000 r/min 离心 2 min, 取出上层液。同法再提取 1 次, 合并上层液, 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, 取滤液 20 μL 进行 HPLC 分析。以样品峰与内标峰面积比对相应的组分质量浓度进行线性回归, 结果线性范围均为 0.25 ~ 3.0 μg/mL, 并得到标准曲线方程和线性系数。心脏: $Y = 0.04251 + 0.4775X$ ($r = 0.9951$), 肝脏: $Y = 0.02931 + 0.4906X$ ($r = 0.9956$), 脾脏: $Y = 0.07752 + 0.4067X$ ($r = 0.9961$), 肾脏: $Y = 0.09823 + 0.4170X$ ($r = 0.9953$), 睾丸: $Y = 0.01579 + 0.5097X$ ($r = 0.9968$), 骨骼肌: $Y =$

$0.06391 + 0.4312X$ ($r = 0.9961$), 脑组织: $Y = 0.04293 + 0.3553X$ ($r = 0.9956$), 脂肪: $Y = 0.05163 + 0.3589X$ ($r = 0.9949$), 肠道: $Y = 0.05968 + 0.3519X$ ($r = 0.9943$)。

2.3.2 专属性考察: 按照选定的色谱条件, 测定华蟾蜍毒素对照溶液、用药前大鼠空白组织、用药后大鼠组织中华蟾蜍毒素质量浓度, 按照生物样品处理方法处理各个组织样品后进行色谱分析, 华蟾蜍毒素的保留时间为 6.1 min, 大鼠组织中的内源性杂质不干扰华蟾蜍毒素的测定。

2.3.3 精密度试验: 取 1 mL 空白组织匀浆液加入不同量的华蟾蜍毒素对照品溶液, 分别配制成含华蟾蜍毒素 50、100 μg/mL 样品, 在 1 d 内重复测定 5 次; 1 d 测定 1 次 (-20 °C 保存), 连续 5 d, 计算各组织日内和日间 RSD, 结果见表 1。显示各组织中 2 种质量浓度的日内、日间 RSD 均小于 10%, 说明该分析方法的精密度符合要求。

表 1 精密度试验结果

Table 1 Results of precision test

组 织	50 μg · mL ⁻¹		100 μg · mL ⁻¹	
	日 内 RSD / %	日 间 RSD / %	日 内 RSD / %	日 间 RSD / %
心脏	1.6	5.3	1.5	5.6
肝脏	1.7	5.5	1.4	5.8
脾脏	1.6	6.2	1.6	5.6
脑组织	1.6	5.5	1.3	5.0
肠道	1.9	5.9	1.8	4.8
肾脏	1.7	4.8	1.7	5.1
睾丸	2.1	5.3	1.7	4.7
骨骼肌	2.2	6.2	1.9	7.1
脂肪	2.1	9.8	2.6	8.9

2.3.4 方法回收率试验: 取空白大鼠各组织匀浆液 1 mL 共两份, 加入不同量的华蟾蜍毒素对照品溶液, 分别配制成含华蟾蜍毒素 50、100 μg/mL 样品, 测定, 各 5 次, 以华蟾蜍毒素的测得量/加入量 × 100% 计算回收率, 结果见表 2。表明样品中华蟾蜍毒素的回收率均达到 93% 以上。

2.4 组织样品取样方法: 70 只大鼠随机分成 2 组, 即华蟾蜍毒素低、高两个剂量组, 每组 35 只, 按 1 mL/100 g 舌下静脉分别 iv 50、100 μg/mL 华蟾蜍毒素溶液。各实验组分别在舌下静脉 iv 给药后第 30、60、90、120、180、240、360 min 准时取 5 只大鼠断头取血, 同时尽快解剖大鼠, 摘取大鼠心脏、肝脏 (上叶)、肾脏、脑组织、脾脏、右侧后腿骨骼肌、睾丸、小肠上段 4~5 cm、脂肪, 生理盐水清洗, 滤纸吸干。

表 2 回收率试验结果
Table 2 Results of recovery test

组 织	回收率/ %	
	50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
心脏	96.34 $\pm$ 2.8	94.32 $\pm$ 2.4
肝脏	97.65 $\pm$ 2.6	96.25 $\pm$ 2.1
脾脏	95.01 $\pm$ 3.1	95.13 $\pm$ 4.1
脑组织	94.35 $\pm$ 2.2	93.35 $\pm$ 1.4
肠道	94.38 $\pm$ 2.4	93.98 $\pm$ 2.1
肾脏	97.35 $\pm$ 2.0	94.89 $\pm$ 1.8
睾丸	95.44 $\pm$ 2.1	95.21 $\pm$ 2.2
骨骼肌	95.37 $\pm$ 1.8	95.21 $\pm$ 2.0
脂肪	94.39 $\pm$ 2.3	94.75 $\pm$ 1.5

2.5 组织样品处理方法:分别精密称量各组织 350 ~ 500 mg,按 1 : 4 的比例加入生理盐水,用高速组织匀浆机匀浆;取尖底玻璃离心管,加入 20 μL 内标液,挥干溶剂后加入 1 mL 组织匀浆液,旋涡混合器上间断振荡混匀 2 min。然后加入提取液乙酸-醋酸乙酯(5 : 1) 4 mL,旋涡混合器上间断振荡 3 min,2 000 r/min 离心 10 min,取出上清液。同法再提取一次,合并倾出液,置于水浴摇床上(40 $^{\circ}\text{C}$, 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,滤膜滤过,进样 20 μL ,

进行 HPLC 分析。

2.6 实验结果:不同剂量不同时间点华蟾蜍毒素在大鼠各组织中的分布见表 3。结果显示,大鼠舌下静脉 iv 华蟾蜍毒素后,组织分布较快,给药后 30 min,除脂肪外其余 8 个组织均可测到华蟾蜍毒素;给药后 60 min,大部分血流丰富组织即达到药物浓度峰值,其中肝脏华蟾蜍毒素质量浓度最高,其他组织依次是脾脏、脑组织、骨骼肌、睾丸、肾脏;到 120 min 华蟾蜍毒素在脂肪中才达到较高浓度,而小肠中华蟾蜍毒素浓度的达峰时间则更长,在 180 min 以后。

给药后 240 min,心脏、脑组织、骨骼肌、脾脏、睾丸、脂肪中已经测不到华蟾蜍毒素,说明在这些组织中华蟾蜍毒素消除较快,而在肝脏,尤其是在肾脏中则消除得相对较慢。当给药浓度成倍增加时,华蟾蜍毒素在各组织中的达峰时间并没有变化,只是相应时间点的药物浓度均略有升高,药物消除的时间也相应延长。研究还显示,在肠道中检测到华蟾蜍毒素,表明华蟾蜍毒素可能有肠肝循环的迹象。

3 讨论

给药方法的选择:在预实验中,对 3 组大鼠分别采用 ig、ip、舌下静脉 iv 给药方法。结果发现,ig 给

表 3 大鼠舌下静脉给药不同剂量华蟾蜍毒素后不同时间的组织药物浓度分布

Table 3 Drug distribution of cinobufagin in various dosages at different periods to rats by sublingual iv injection

组织	iv 1 mg $\cdot \text{kg}^{-1}$ 华蟾蜍毒素后组织药物质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)						
	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min	240 min	360 min
心脏	2.975 $\pm$ 0.274	2.527 $\pm$ 0.235	2.450 $\pm$ 0.291	1.632 $\pm$ 0.181	0.748 $\pm$ 0.093	0.397 $\pm$ 0.043	—
肝脏	2.395 $\pm$ 0.322	8.871 $\pm$ 1.061	3.775 $\pm$ 0.539	3.476 $\pm$ 0.434	3.203 $\pm$ 0.405	2.050 $\pm$ 0.283	1.221 $\pm$ 0.167
脾脏	3.678 $\pm$ 0.832	5.305 $\pm$ 0.756	3.296 $\pm$ 0.655	2.786 $\pm$ 0.821	2.518 $\pm$ 0.705	0.832 $\pm$ 0.333	—
脑组织	2.408 $\pm$ 0.231	4.762 $\pm$ 0.365	1.563 $\pm$ 0.144	0.976 $\pm$ 0.065	0.908 $\pm$ 0.055	—	—
肠道	0.746 $\pm$ 0.082	0.793 $\pm$ 0.110	0.862 $\pm$ 0.120	0.811 $\pm$ 0.090	1.309 $\pm$ 0.120	1.349 $\pm$ 0.150	—
肾脏	2.982 $\pm$ 0.269	3.047 $\pm$ 0.335	2.820 $\pm$ 0.362	2.625 $\pm$ 0.384	2.185 $\pm$ 0.201	2.029 $\pm$ 0.525	1.437 $\pm$ 0.655
睾丸	1.427 $\pm$ 0.456	3.912 $\pm$ 0.488	1.351 $\pm$ 0.398	1.297 $\pm$ 0.426	1.261 $\pm$ 0.322	0.519 $\pm$ 0.201	—
骨骼肌	21.880 $\pm$ 5.340	4.672 $\pm$ 0.998	2.316 $\pm$ 0.521	1.844 $\pm$ 0.425	1.675 $\pm$ 0.686	—	—
脂肪	0.752 $\pm$ 0.023	1.379 $\pm$ 0.235	1.582 $\pm$ 0.566	1.245 $\pm$ 0.453	0.862 $\pm$ 0.223	0.711 $\pm$ 0.236	—

组织	iv 0.5 mg $\cdot \text{kg}^{-1}$ 华蟾蜍毒素后组织药物质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)						
	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min	240 min	360 min
心脏	1.621 $\pm$ 0.183	0.969 $\pm$ 0.102	1.251 $\pm$ 0.112	0.874 $\pm$ 0.111	0.459 $\pm$ 0.045	—	—
肝脏	1.830 $\pm$ 0.203	6.688 $\pm$ 0.756	2.992 $\pm$ 0.323	2.654 $\pm$ 0.214	2.037 $\pm$ 0.221	1.651 $\pm$ 0.323	1.193 $\pm$ 0.345
脾脏	2.627 $\pm$ 0.412	3.172 $\pm$ 0.423	2.830 $\pm$ 0.265	2.329 $\pm$ 0.235	0.804 $\pm$ 0.102	—	—
脑组织	2.254 $\pm$ 0.123	4.672 $\pm$ 0.365	1.413 $\pm$ 0.223	0.926 $\pm$ 0.13	0.891 $\pm$ 0.150	—	—
肠道	0.720 $\pm$ 0.056	0.750 $\pm$ 0.062	0.596 $\pm$ 0.035	1.024 $\pm$ 0.069	0.609 $\pm$ 0.072	1.399 $\pm$ 0.356	—
肾脏	2.746 $\pm$ 0.423	2.747 $\pm$ 0.368	2.659 $\pm$ 0.623	2.637 $\pm$ 0.656	1.848 $\pm$ 0.521	1.874 $\pm$ 0.823	2.492 $\pm$ 1.096
睾丸	0.851 $\pm$ 0.121	2.755 $\pm$ 0.356	1.004 $\pm$ 0.231	1.247 $\pm$ 0.623	0.709 $\pm$ 0.325	—	—
骨骼肌	1.392 $\pm$ 0.365	3.546 $\pm$ 0.465	1.793 $\pm$ 0.296	1.56 $\pm$ 0.623	1.509 $\pm$ 0.745	—	—
脂肪	0.215 $\pm$ 0.012	0.322 $\pm$ 0.111	1.100 $\pm$ 0.466	1.295 $\pm$ 0.485	0.807 $\pm$ 0.223	—	—

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ip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ip给药,药物直接入血,干扰因素较少,数据更为可靠。目前临床上所用的华蟾蜍毒素制剂以注射液为主,静脉给药的研究方法对临床更有指导意义。

提取条件的选择:组织中提取华蟾蜍毒素时,笔者参照前期血清中蟾蜍灵测定研究方法,采用混合有机溶剂萃取的方法提取血清样品中的华蟾蜍毒素^[5,6]。即取匀浆后的组织,加入内标后,加入提取液乙醚-醋酸乙酯(5:1)4mL,旋涡混合器上间断振荡混合3min,是为了让组织的匀浆液及血清与提取液之间充分混合,间断振荡是为了减少组织匀浆液的乳化,从而使样品易于提取充分。

肺组织按照同样的方法进行实验,未测得华蟾蜍毒素;肾上腺组织质量过轻,无法获取足够组织匀浆液进行进一步分析,因此实验结果中没有这两个组织的数据。

参考文献:

- [1] 高艳荣,张莉,张磊,等.蟾酥及其有效成分的药理作用及机制研究进展[J].武警医学院学报,2003,12(5):406-408.
- [2] 程国华.蟾酥质量研究及其药理临床应用进展[J].中草药,2001,32(2):184-186.
- [3] 张磊,齐刚,张莉,等.高效液相色谱法测定大鼠血清中华蟾素浓度[J].中国医院药学杂志,2006,26(6):692-694.
- [4] 张磊,齐刚,张莉,等.大鼠舌下静脉给药华蟾毒配基的药动学研究[J].中草药,2007,38(2):199-202.
- [5] 张莉,白雪,齐刚,等.RP-HPLC法测定大鼠血清中蟾蜍灵浓度[J].药物分析杂志,2004,24(5):523-525.
- [6] Zhang L, Qi G, Bai X. Pharmacokinetics of bufalin in male rats [J]. Asia J Drug Metab Pharmacokinet, 2003, 3(4): 297-300.

大黄不同炮制品指纹特征的识别研究

孙玉琦^{1,2},马永刚²,肖小河^{2*},刘晓娟¹

(1.辽宁医学院药学院,辽宁 锦州 121001; 2.中国人民解放军中药研究所,北京 100039)

摘要:目的 建立大黄不同炮制品的HPLC指纹图谱,为大黄炮制品的质量评价和炮制机制研究提供依据。方法 采用梯度洗脱HPLC法,建立大黄不同炮制品指纹图谱,运用中药指纹图谱相似度评价方法与样品聚类分析方法,对其指纹特征进行研究。结果 该方法重复性良好,大黄不同炮制品指纹图谱共有峰特征明显,不同炮制品指纹特征存在差异,其化学成分发生了不同程度的变化。其中生大黄与酒大黄、醋大黄差异较小,与熟大黄、清宁片存在差异,与大黄炭差异明显。结论 建立的大黄不同炮制品的指纹图谱可以识别大黄不同炮制品的归属特征,可有效控制内在质量,探讨炮制机制,并可进一步进行大黄的安全性评价和指导临床合理用药。

关键词:大黄;炮制;指纹图谱;HPLC法

中图分类号:R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)05-0725-04

大黄中主要含有蒽醌类、多糖类、鞣质等80多种成分。大黄所含有的大黄素等蒽醌类成分有肝肾毒性和致癌性的潜在危险,长期应用大黄停药后有继发性便秘之虞^[1]。中药炮制是中医用药的一大特色和优点,炮制减毒是中药合理制用的有效途径和手段。大黄的炮制品主要有生大黄、酒大黄、醋大黄、熟大黄、清宁片、大黄炭。大黄经炮制后,其化学组分、药性和毒性都将发生相应的变化。色谱指纹图谱是通过比较各样本间色谱图的差异来反映样品化学成分的差异^[2]。本实验通过对大黄不同炮制品指纹图谱的识别研究,旨在阐明大黄因炮制而产生

的成分变化规律,有效控制大黄的内在质量、探索大黄的炮制机制,进而为大黄的不同炮制品的成分与药效间建立联系,为大黄临床的安全、有效应用提供依据。

1 仪器与试药

美国Agilent 1100高效液相色谱仪,配有DAD;25 μL微量进样器(美国Hamilton);瑞士Mettler Toledo AL204微量分析天平。

纯净水(乐百氏纯净水公司),乙腈为色谱纯试剂,磷酸、甲醇等为分析纯试剂。大黄素、大黄酚、大黄酸、芦荟大黄素、大黄素甲醚对照品由中国药品生

* 收稿日期:2008-07-11

基金项目:“十五”国家科技攻关项目(2004BA721A14)

作者简介:孙玉琦(1978—),辽宁省大连市人,研究方向为中药新剂型新技术。E-mail:cpusyq@163.com

*通讯作者 肖小河 Tel:(010)66933322 Fax:(010)63825768