

蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基大鼠体内药动学研究

刘冬^{1,2}, 杜守颖^{1*}, 何秀峰², 王爱国², 李娜², 沈琬琪²

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

2. 中国医学科学院药物研究所 北京协和药厂, 北京 100050

摘要: 目的 建立检测大鼠血浆中 3 种蟾蜍甙类化合物蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基的 HPLC 法, 并用于蟾酥在大鼠体内的药动学研究。方法 分别于大鼠尾 iv 给予蟾酥提取物 0.8 mg/kg 后 2、5、10、15、20、30、45、60、90 min, 眼眶取血, 采用乙腈沉淀蛋白与液液萃取相结合方法进行血浆样品预处理, 以 HPLC 法测定大鼠血浆中蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基的质量浓度, 以 Kinetica 软件拟合药动学参数。结果 蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基均得到很好的分离, 重现性、精密度、线性关系良好, 达到体内分析要求; 经非房室模型拟合, 得到蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基在大鼠体内主要药动学参数; iv 给药 30 min 时, 血药浓度均降至 C_{max} 的 1/5 以下。结论 建立的蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基血药浓度测定方法操作简单、结果准确可靠; 蟾蜍甙类成分在大鼠体内代谢较为迅速, 所得数据可为蟾酥提取物的药动学研究提供参考。

关键词: 蟾酥提取物; 蟾蜍甙类化合物; 药动学; 蟾毒灵; 华蟾酥毒基; 酯蟾毒配基

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)04-0734-05

Pharmacokinetic study on bufadienolides of bufalin, cinobufagin, and resibufogenin from *Bufo Venenum* in rats *in vivo*

LIU Dong^{1,2}, DU Shou-ying¹, HE Xiu-feng², WANG Ai-guo², LI Na², SHEN Long-ying²

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. Beijing Union Pharmaceutical Factory, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the assay of bufalin (BL), cinobufagin (CBG), and resibufogenin (RBG), and for study on their pharmacokinetics in plasma of rats. **Methods** The rat tail was iv injected with 0.8 mg/kg *Bufo Venenum* extract, then the blood was obtained from the orbit of rats after 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, and 90 min. The combination of protein precipitation with acetonitrile and liquid-liquid extraction was applied to purifying plasma samples and HPLC was used to determine the concentration of BL, CBG, and RBG in them. The pharmacokinetic parameters were assessed by Kinetica software. **Results** The BL, CBG, and RBG separation, precision, accuracy and calibration curves were in line with the requirements of methodology *in vivo*. The main pharmacokinetic parameters were fitted by non-compartment models. After 30 min of administration *in vivo*, the plasma concentrations of BL, CBG, and RBG were reduced below 20% C_{max} respectively in rats. **Conclusion** The established method is simple, rapid, accurate, and precise. BL, CBG, and RBG metabolism are quickly in rats, and the main pharmacokinetic parameters could be referenced in pharmacokinetic study of *Bufo Venenum* extract.

Key words: *Bufo Venenum* extract, bufadienolides; pharmacokinetics; bufalin (BL); cinobufagin (CBG); resibufogenin (RBG)

蟾酥为中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *Bufo melanostictus* Schneider 耳后腺分泌的白色浆液, 经加工、干燥制成^[1]。蟾酥性味甘辛、温, 有毒, 具有解毒、消肿、醒神、开窍、

强心和止痛等作用, 作为传统中药材, 其在我国以及亚洲各国拥有悠久的药用历史, 如中成药六神丸、麝香保心丸等均含有蟾酥。

蟾酥药理活性较强, 作用广泛, 已引起国内外

收稿日期: 2011-11-29

基金项目: “十一五”重大新药创制项目(2009ZX09502-008); “中药生产技术与过程控制技术标准平台”(2009ZX09308-003); 教育部博士点基金(20090013110007); 北京中医药大学中药复方制药创新团队(2011-CXTD-13)

作者简介: 刘冬(1978—), 男, 助理研究员, 博士研究生, 研究方向为中药新剂型及体内药物分析。

Tel: (010)83165745 Fax: (010)63027252 E-mail: imldd@yahoo.com.cn

*通讯作者 杜守颖 Tel: (010)84738615 E-mail: dushouying@263.net

学者的广泛关注。蟾酥中的主要成分有蟾蜍甙二烯类、强心甙类、吲哚碱类、醇类及多糖、氨基酸、肽类以及肾上腺素等,其有效成分多为脂溶性成分,其中蟾毒灵(bufoalin, BL)、华蟾酥毒基(cinobufagin, CBG)、酯蟾毒配基(resibufogenin, RBG)等占较大比例(约10%),它们对心血管系统、肿瘤细胞均有显著的药理活性^[2-4]。但由于蟾酥毒性较大,故其提取物的体内药动学特点是重要的研究课题。目前蟾蜍甙类成分血药浓度测定方法有HPLC-MS、SPE-HPLC法等^[5-8],而相关药动学方面研究以蟾酥粗提物或成方(六神丸)较常见,而蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基3种蟾蜍甙类成分高纯度组合物在大鼠体内的药动学研究未见报道。本实验参考相关文献方法^[9],采用乙腈沉淀蛋白与液液萃取相结合方法进行血浆样品预处理,建立了测定大鼠血浆中蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基的HPLC法,并将该法用于蟾蜍甙类化合物体内药动学研究,为蟾酥的安全用药提供参考。

1 材料

1.1 药品与试剂

蟾酥,购自北京闫村蟾蜍养殖基地(经北京中医药大学中药学院刘春生教授鉴定为蟾酥正品),蟾酥提取物自制,即药材粉碎后过65目筛,经乙醇提取、浓缩,采用干法上样,硅胶柱色谱分离,精制等工艺,得到含蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基3种蟾蜍甙类成分的组合物,3种成分的质量分数分别约25%、37%、35%。华蟾酥毒基(批号110803-200605)、酯蟾毒配基(批号110718-200507)、醋酸甲地孕酮(批号10171-0102)对照品购于中国药品生物制品检定所;蟾毒灵对照品(批号070601),天津马克生物有限责任公司。乙腈, HPLC级,美国Fisher公司;醋酸乙酯、甲醇均为分析纯,水为超纯水。

1.2 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱系统(二极管阵列检测器); Millipore Q 超纯水机,美国 Millipore 公司; 岛津 AW120 电子分析天平(日本岛津公司); Vortex-2 型涡旋混合机,美国 Scientific Industrious 公司; HC-2064 高速离心机,科大创新有限公司; Kinetica 4.4.1 药代动力学分析软件, InnaPhase 公司。

1.3 动物

SD 大鼠,体质量 220~260 g,雌雄各半,中国药品生物制品检定所实验动物中心提供,许可证

号 SCXK-(京) 2007-0001。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

迪马 Dimosail-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 预柱(12.5 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(55:45), 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 296 nm, 柱温 30 °C, 进样量 30 μL。

2.2 血浆样品处理

取大鼠血浆 0.3 mL 置于 5 mL 具塞塑料离心管中,加入醋酸甲地孕酮内标溶液(1.6 μg/mL) 8 μL, 涡旋振荡 0.5 min 混匀,加入乙腈 0.6 mL, 涡旋振荡 3.0 min 沉蛋白,加入醋酸乙酯 2.0 mL, 涡旋萃取 10 min, 11 000 r/min 离心 10 min; 共提取两次。合并上层有机相置另一塑料离心管中,40 °C 水浴氮气流挥干,残渣加入 100 μL 流动相涡旋振荡 10.0 min 使之溶解,13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 30 μL 进行 HPLC 分析。

2.3 对照品和内标溶液的制备

分别精密称取蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基 3 种对照品和内标醋酸甲地孕酮适量,分别置于 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解配制成 200 μg/mL 对照品储备液和 160 μg/mL 内标储备液,以流动相稀释得到相应质量浓度的对照品溶液及内标溶液。精密量取蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基对照品储备液适量,置同一量瓶中,加流动相稀释至刻度、摇匀,制成蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基质量浓度均为 20 μg/mL 的溶液作为混合对照品溶液。上述溶液均于 4 °C 冰箱保存。

2.4 专属性试验

取大鼠空白血浆,空白血浆+蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基对照品混合溶液(4.0 μg/mL),空白血浆+内标醋酸甲地孕酮(1.6 μg/mL)和给药后血浆样品,按“2.2”项下操作后进行分析,结果见图 1。可见大鼠空白血浆对给药血浆中蟾毒灵(5.6 min)、华蟾酥毒基(7.3 min)、酯蟾毒配基(7.8 min)的测定无干扰,3 种成分以及内标物质无相互干扰。理论塔板数按蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基计均大于 6 000,分离度均大于 1.5。

2.5 线性关系考察与定量限

分别量取空白血浆 0.3 mL 8 份,精密加入不同质量浓度的对照品储备液使血浆中蟾毒灵的质量浓度为 37.5、75.0、150、375、940、1 880、3 760 ng/mL,

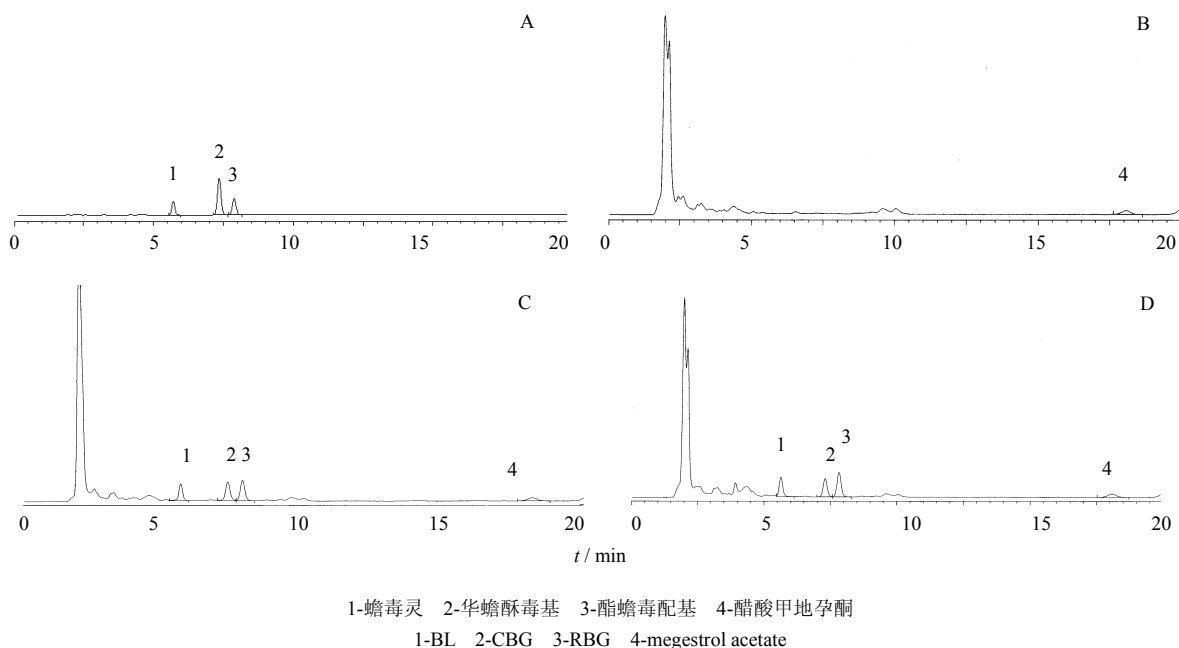


图 1 蟾酥提取物 (A)、空白血浆+内标 (B)、空白血浆+蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基混合对照品+内标 (C) 和给药后血浆样品 (D) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Bufo venenum* extract (A), blank plasma + megestrol acetate (B), blank plasma + mixed reference substances of BL, CBG, and RBG + megestrol acetate (C), and plasma sample with drug (D) in rats

按“2.2”项下方法操作后进行分析。以血浆中蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基的质量浓度为横坐标 (X), 不同成分与内标峰面积比为纵坐标 (Y), 采用最小二乘法进行线性回归, 得蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基的标准曲线回归方程为蟾毒灵 $Y=1.10X+0.042$, $r=0.9975$; 华蟾酥毒基 $Y=1.53X+0.047$, $r=0.9931$; 酯蟾毒配基 $Y=1.69X+0.026$, $r=0.9973$; 线性范围分别为 $37.5\sim3760$ 、 $41.6\sim4160$ 、 $35.7\sim3570$ ng/mL。

在信噪比 (S/N) 为 10 的条件下, 血浆中蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基最低定量限分别为 20.0、20.0、19.6 ng/mL。

2.6 精密度试验

空白血浆 0.3 mL 中分别精密加入不同质量浓度的混合对照品溶液, 配制成低、中、高 3 种质量浓度 (0.045、0.376、1.875 $\mu\text{g/mL}$) 的血浆样品, 各制备 5 份, 按“2.2”项下操作后进样分析, 分别于日内和 5 d 内测定各样品, 计算日内和日间精密度。结果日内精密度: 蟾毒灵低、中、高质量浓度的 RSD 分别为 7.82%、5.14%、5.96%, 华蟾酥毒基的 RSD 分别为 6.92%、3.69%、9.53%, 酯蟾毒配基的 RSD 分别为 3.44%、8.34%、7.71%; 日间精密度: 蟾毒灵低、中、

高质量浓度的 RSD 分别为 9.76%、4.31%、6.72%, 华蟾酥毒基的 RSD 分别为 6.08%、4.33%、5.14%, 酯蟾毒配基的 RSD 分别为 4.09%、4.87%、5.78%。

2.7 回收率试验

2.7.1 方法回收率 空白血浆 0.3 mL 中分别精密加入不同质量浓度混合对照品溶液, 配制成低、中、高 3 种质量浓度 (0.045、0.376、1.875 $\mu\text{g/mL}$) 的质控样品, 取 3 种质量浓度对照品血浆各 5 份, 按“2.2”项下操作后进样分析, 以当日当批回归方程计算蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基质量浓度, 与加样质量浓度比较, 计算方法回收率。结果低、中、高 3 个质量浓度的方法回收率: 蟾毒灵分别为 (103.3 \pm 4.8) %、(100.6 \pm 5.7) %、(96.9 \pm 4.0) %; 华蟾酥毒基分别为 (100.6 \pm 9.8) %、(91.5 \pm 6.2) %、(98.3 \pm 5.0) %; 酯蟾毒配基分别为 (96.7 \pm 6.5) %、(93.9 \pm 2.4) %、(92.5 \pm 1.5) %。上述 3 种成分不同质量浓度的回收率 RSD 均在 15% 以内。

2.7.2 萃取回收率 空白血浆 0.3 mL 中分别精密加入不同质量浓度的混合对照品溶液, 配制成低、中、高 3 种质量浓度 (0.045、0.376、1.875 $\mu\text{g/mL}$) 的质控样品各 5 份, 按“2.2”项下操作后进样分析, 以血浆中蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基的峰面

积与相应质量浓度混合对照品溶液中蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基峰面积的比值计算出上述 3 种质量浓度的萃取回收率。结果低、中、高 3 个质量浓度的萃取回收率：蟾毒灵分别为 (103.3±7.7)%、(97.4±6.8)%、(99.7±5.5)%；华蟾酥毒基分别为 (103.3±4.9)%、(94.9±3.8)%、(97.9±3.0)%；酯蟾毒配基分别为 (103.4±5.9)%、(100.0±4.4)%、(97.9±4.6)%。上述 3 种成分不同质量浓度的回收率 RSD 均在 20% 以内。

2.8 稳定性试验

空白血浆 0.3 mL 中分别精密加入不同质量浓度混合对照品溶液，配制成低、中、高 3 种质量浓度 (0.045、0.376、1.875 μg/mL) 的质控样品各 4 份，分别于 4 °C 条件下存放 12、24 h 和 1 周，于 -20 °C 存放 1 个月后测定。结果显示，血浆中的蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基在 4 °C 条件下存放 1 周和 -20 °C 存放 1 个月后保持稳定，RSD 分别为 7.7%、6.0%、9.8%，均符合小于 15.0% 的规定。

2.9 药动学研究

取 SD 大鼠 6 只，雌雄各半，于尾静脉缓慢 iv 给予 0.8 mg/kg 蟾酥提取物 (20% 注射用无水乙醇生

理盐水溶液溶解，配制成质量浓度为 0.8 mg/mL)，分别于给药前、给药后 2、5、10、15、20、30、45、60、90 min 于眼眶取血，肝素抗凝，3 500 r/min 离心 10 min 得样品血浆。按“2.2”项下操作后进样，分析大鼠血浆中蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基水平，得血药浓度-时间数据，经 Kinetica 4.4.1 软件非房室模型拟合，得到大鼠在给药后的平均血药浓度-时间曲线，见图 2，主要药动学参数见表 1。

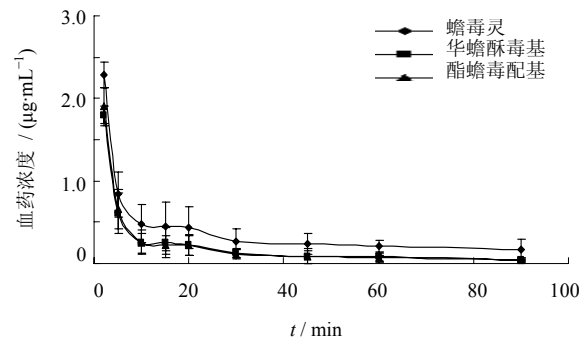


图 2 蟾酥提取物 iv 给药后蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Concentration-time profiles for BL, CBG, and RBG in plasma of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 1 蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基在大鼠体内的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of BL, CBG, and RBG in rats *in vivo* ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	蟾毒灵	华蟾酥毒基	酯蟾毒配基
C_{max}	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	2.29 ± 0.15	1.80 ± 0.12	1.92 ± 0.20
$t_{1/2}$	min	24.32 ± 3.78	22.58 ± 5.58	27.17 ± 4.26
AUC_{0-90}	$\mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$	32.25 ± 8.95	17.32 ± 2.98	17.07 ± 2.82
$AUMC_{0-90}$	$\mu\text{g}\cdot\text{min}^2\cdot\text{mL}^{-1}$	904.31 ± 401.52	354.61 ± 114.71	315.47 ± 104.33
MRT_{0-90}	min	27.14 ± 6.02	20.12 ± 3.90	18.23 ± 4.04

3 讨论

在实验过程中，曾尝试仅用乙腈沉淀蛋白的方法，但回收率较低，且样品吹干的时间较长；后增加了有机溶剂萃取，并尝试乙醚、正己烷、醋酸乙酯以及不同配比的乙醚-醋酸乙酯混合溶剂等，最终确定乙腈沉淀蛋白后再采用醋酸乙酯萃取的方法，得到了较为满意的结果。

本实验建立了测定大鼠血浆中蟾酥脂溶性成分蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基的 HPLC 法，并采用单次 iv 给药研究上述 3 种成分在大鼠体内的药动学特点，得到 3 种成分的主要药动学参数及血药浓度-时间曲线。结果表明，本方法操作简单、结果

准确可靠，蟾蜍甾烯类成分在大鼠体内代谢较为迅速，iv 给药 30 min 时，血药浓度均降至 C_{max} 的 1/5 以下，与相关文献报道一致^[9]。

蟾酥具有镇痛、抗炎、抗肿瘤等多种药理活性，其脂溶性成分为主要活性成分，但由于其局部刺激性及毒性较强，使其静脉途径给药受到很大制约。目前，蟾酥的药剂学研究主要集中在透皮、黏膜等其他给药途径。本实验结果可为蟾酥提取物以及蟾酥中蟾蜍甾烯类成分体内测定方法的建立、其他给药途径药动学以及相对生物利用度等方面的研究提供参考。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

- [2] 赵 强, 孟凡静, 刘安西. 蟾酥的研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(10): 附 4-附 7.
- [3] 杨 琳, 段鹏飞, 王 琼, 等. 蟾酥脂溶性提取物的分离分析及其镇痛、抗肿瘤作用研究 [J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 29(1): 64-67.
- [4] 于垂亮, 侯惠民. 蟾酥抗肿瘤有效成分的活性追踪分离及急性毒性研究 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 307-311.
- [5] Cao Y, Zhao L L, Liang Q L, *et al.* Study of the determination and pharmacokinetics of bufadienolides in dog's plasma after administration of Liu-Shen-Wan by high performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 853(1/2): 227-233.
- [6] Zhang Y, Tang X, Liu X L, *et al.* Simultaneous determination of three bufadienolides in rat plasma after intravenous administration of bufadienolides extract by ultra performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 610(2): 224-231.
- [7] Liang Y, Liu A H, Qin S, *et al.* Simultaneous determination and pharmacokinetics of five bufadienolides in rat plasma after oral administration of Chansu extract by SPE-HPLC method [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 46(3): 442-448.
- [8] 刘 冬, 杜守颖, 何秀峰, 等. 蟾酥提取物中 2 种蟾蜍甙烯类成分兔体内药代动力学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 135-138.
- [9] 杨 勇, 奉建芳, 卢 洁, 等. 蟾酥固体脂质纳米粒冻干针剂体内药代动力学研究 [J]. 中成药, 2006, 28(6): 787-790.

《中草药》杂志最新佳绩

《中草药》杂志 2011 年荣获**第二届中国出版政府奖**，中国出版政府奖是国家新闻出版行业的最高奖，第二届中国出版政府奖首次设立期刊奖，《中草药》等 10 种科技期刊获此殊荣。2011 年 3 月 18 日于北京举行了盛大的颁奖典礼。

《中国科技期刊引证报告》2011 年 12 月 2 日发布：《中草药》杂志 2010 年总被引频次 6 178，名列我国科技期刊第 14 名，中医学与中药类期刊**第 1 名**；**影响因子 0.904**，基金论文比 0.680，权威因子 2 269.200；综合评价总分 76.6，位列中医学与中药学类期刊第 1 名。连续 7 年（2005—2011 年）荣获“百种中国杰出学术期刊”，再次荣获“中国精品科技期刊”（2008 年首次设立，每 3 年一届），荣获天津市第十届优秀期刊评选特别奖。

中国知网（CNKI）《中国学术期刊影响因子年报》2011 年 12 月 22 日发布：《中草药》杂志总被引频次 16 359，影响因子 1.453，位列中医学与中药学期刊第 1 名，基金论文比 0.74，WEB 下载量 39.1 万次。

2011 年注册商标“**中草药**”被评为天津市著名商标。