

蟾酥提取物中 3 种蟾蜍甙烯类 成分比格犬体内药代动力学

刘冬¹, 何秀峰^{1*}, 杜守颖², 王爱国¹, 代春红¹, 顾雪竹³, 赵立敏¹

(1. 中国医学科学院药物研究所 北京协和药厂, 北京 100050;

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立犬血浆中蟾酥提取物中 3 种蟾蜍甙烯类化合物蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基的分析方法, 并用于其在犬体内的药代动力学研究。方法: 比格犬按 $0.18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 由股静脉注射蟾酥提取物后分别于 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 min 股静脉取血, 采用乙腈沉淀蛋白与固相萃取相结合方法进行血浆样品预处理, 以 HPLC 方法测定犬血浆中蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基的浓度, 以 Kinetica 软件拟合药代动力学参数。结果: 建立的 SPE-HPLC 方法, 蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基均得到很好的分离, 重复性、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, 得到了蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基在犬体内主要药代动力学参数。结论: 建立的蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基比格犬血药浓度 SPE-HPLC 方法及所获得的药代动力学参数, 可为中药蟾酥提取物的药代动力学研究提供参考。

[关键词] 蟾酥提取物; 蟾蜍甙烯类化合物; 药代动力学; 犬; 固相萃取小-高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0188-05

[doi] 10.11653/syfy2013170188

Simultaneous Determination and Pharmacokinetics of Three Bufadienolides in Dogs

LIU Dong¹, HE Xiu-feng^{1*}, DU Shou-ying², WANG Ai-guo¹, DAI Chun-hong¹, GU Xue-zhu³, ZHAO Li-min¹

(1. Institute of Materia Medica Chinese Academy of Medical Sciences

Beijing Union Pharmaceutical Factory, Beijing 100050, China;

2. School of Chinese Pharmacy Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

3. Institute of Chinese Madica, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the assay of bufalin (BL), cinobufagin (CBG), resibufogenin (RBG) and study the pharmacokinetics of BL, CBG, RBG in dogs plasma. **Method:** The sample blood from dogs were injected Chan Su extract by $0.18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ at 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 min. Protein precipitation with acetonitrile and solid-phase extraction were applied to purify plasma samples and used HPLC to determine the concentration of BL, CBG, RBG in it. The pharmacokinetics parameters were accessed by Kinetica software. **Result:** In this SPE-HPLC method, the separation, precision and accuracy of BL, CBG, RBG were well. The calibration curves were linear. The analytical recoveries were all more than 90%, intra and inter-day precision RSD were all less than 10.0% ($n=5$). The main pharmacokinetics parameters were fitted by non-compartment models. **Conclusion:** The SPE-HPLC method can be used to determine the concentration and to investigate the pharmacokinetics of BL, CBG and RBG.

[Key words] Chan Su extract; bufadienolides; pharmacokinetics; dog; SPE-HPLC

[收稿日期] 20130409(015)

[基金项目] 中药生产技术与过程控制技术标准平台(2009ZX09308-003)

[第一作者] 刘冬, 博士, 助理研究员, 从事中药制剂、药物分析研究, Tel: 010-83165745, E-mail: imldld@163.com

[通讯作者] * 何秀峰, 学士, 副研究员, 从事新药研发, Tel: 010-63027252, E-mail: hexiufeng111@sina.com

蟾酥为中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *Bufo melanostictus* Schneider 的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。蟾酥作为传统中药材的一种,其使用在我国以及亚洲有着悠久的历史,常用中成药六神丸、麝香保心丸等均含有该味药材。蟾酥中的主要成分有强心甙类、吡啶碱类、醇类及多糖、氨基酸、肽类以及肾上腺素等。经现代研究发现,蟾酥的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)等占较大比重(约占10%),其对于心血管系统、肿瘤细胞均有显著的药理活性^[2-3]。本实验所采用的蟾酥提取物为蟾酥经提取、分离纯化工艺,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;经测定上述3成分比例固定(BL约占25%、CBG约占37%、RBG约占35%),总含量占质量百分比的95%以上。

由于蟾酥毒性较大,故该提取物体体内药代动力学研究显得尤为重要。目前,蟾蜍甙类成分血药浓度测定方法有HPLC-MS, HPLC法等^[4-6],其应用动物为小鼠、兔及比格犬等,所使用的一般为蟾酥粗提物或成方(六神丸),现有文献未见此类高纯度组合物在犬体内的药代动力学研究。本文通过参考相关文献^[7-10],采用乙腈沉蛋白与固相微萃取相结合方法进行血浆样品处理,建立了犬血浆中蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基的SPE-HPLC测定法,并将该法应用于6只犬单剂量静脉注射蟾蜍甙类化合物后药代动力学研究。

1 材料

Agilent 1200型高效液相色谱系统(二极管阵列检测器), Millipore Q型超纯水机(美国Millipore公司), 岛津AW120型电子分析天平(日本岛津), Vortex-2型涡旋混合机(美国Scientific Industries), HC-2064型高速离心机(科大创新有限公司), Kinetica 4.4.1(InnaPhase Co.)药代动力学分析软件。美国瓦里安公司Bond Elute C₁₈-SPE小柱(200 mg, 3 mL)、乙腈为HPLC级(美国Fisher公司), 乙酸乙酯、甲醇均为分析纯(北京化工厂), 水为超纯水(自制); 华蟾酥毒基、酯蟾毒配基、醋酸甲地孕酮对照品(中国药品生物制品检定研究院, 批号分别为110803-200605, 110718-200507, 10171-0102), 蟾毒灵对照品(天津马克生物有限责任公

司, 纯度>99%), 蟾酥(购自安徽广印堂中药饮片有限公司, 批号为20100901), 蟾酥提取物(自制, 纯度>95%)。

实验动物: 比格犬6只, 7.5~9.0 kg, 雌雄各半, 由北京日新科技有限公司提供, 许可证号SCXK-(京)2011-0007。

2 方法与结果

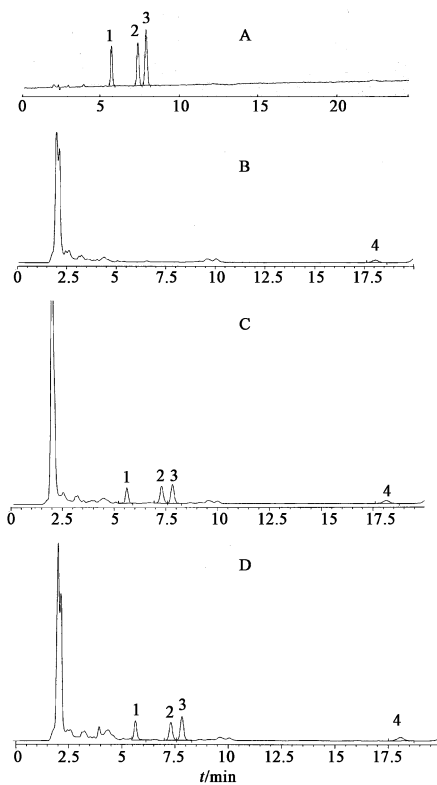
2.1 色谱条件 迪马Dimosail-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)色谱柱, Agilent Eclipse XDB-C₁₈预柱(4.6 mm × 12.5 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水(55:45), 流速1.0 mL·min⁻¹, 检测波长296 nm, 柱温30℃, 进样量30 μL。

2.2 溶液的配制 精密称取BL, CBG, RBG对照品和内标醋酸甲地孕酮适量, 分别置50 mL量瓶中, 加甲醇溶解配制成含上述3种蟾蜍甙类成分分别为196, 207, 211 mg·L⁻¹对照品储备液和100 mg·L⁻¹内标储备液; 精密量取适量, 以流动相稀释得到相应浓度对照品溶液及内标溶液, 于4℃冰箱保存。

2.3 血浆样品的处理 取犬血浆1.0 mL置5 mL具塞塑料离心管中, 加入醋酸甲地孕酮内标溶液(8.0 mg·L⁻¹)20 μL, 涡旋振荡2.0 min混匀, 加入乙腈1.6 mL, 涡旋振荡3.0 min沉蛋白, 离心(11 000 r·min⁻¹)10 min, 提取2次; 合并上层有机相置另一塑料离心管中, 40℃水浴氮气流挥干, 残渣中加入50%甲醇水溶液2.0 mL, 旋振荡10.0 min使溶解, 转移至预先以4.0 mL甲醇以及4.0 mL水活化后的SPE小柱中, 分别以10%甲醇水溶液4.0 mL、50%甲醇水溶液4.0 mL淋洗小柱, 弃去淋洗液, 最终以1%乙酸甲醇溶液3.0 mL洗脱小柱, 收集洗脱液置另一塑料离心管中, 40℃水浴氮气流挥干, 残渣中加入100 μL流动相涡旋振荡10.0 min使溶解, 离心(13 000 r·min⁻¹)10 min, 取上清液30 μL进行HPLC分析。

2.4 方法的专属性 犬空白血浆、犬空白血浆外加对照品混合溶液蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基(均为4.0 mg·L⁻¹)、内标醋酸甲地孕酮(1.6 mg·L⁻¹)及给药后血浆样品, 按2.3项下操作后进行分析, 色谱图见图1。结果表明, 空白犬血浆对血浆中BL(5.7 min), CBG(7.4 min), RBG(7.9 min)的测定无干扰, 3种成分以及内标物质相互无干扰。理论塔板数按BL, CBG, RBG计均>4 000, 分离度均>1.5。

2.5 线性关系与定量限 分别量取空白血浆1.0 mL 8份, 精密加入不同体积或浓度的对照品混合溶液使血浆中BL质量浓度依次为7.4, 14.8,



A. 蟾酥提取物; B. 空白血浆 + 内标;
C. 空白血浆 + BL, CBG, RBG; D. 给药后 15 min 血浆样品
1. 蟾毒灵 (BL); 2. 华蟾酥毒基 (CBG);
3. 酯蟾毒配基 (RBG) 4. 内标 [Megestrol Acetate (IS)]

图 1 蟾酥提取物、犬血浆中 BL, CBG, RBG 以及内标的高效液相色谱

22.4, 37.0, 74.0, 112.1, 185.0 及 277.6 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, CBG 质量浓度依次为 7.5, 15.0, 22.7, 37.6, 75.2, 113.9, 188.0 及 282.1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, RBG 质量浓度依次为 7.0, 14.0, 21.2, 35.0, 70.0, 106.1, 175.0 及 262.6 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品血浆, 按 2.3 项下操作后进行分析。以血浆中添加 BL, CBG, RBG 的质量浓度为 X 轴, 不同成分与内标峰面积比为 Y 轴, 采用最小二乘法进行线性回归, 得 BL, CBG, RBG 的标准曲线回归方程为 $Y_{\text{BL}} = 8.8 \times 10^{-3} X - 4.6 \times 10^{-2}$ ($r = 0.9991$), $Y_{\text{CBG}} = 6.7 \times 10^{-3} X - 1.1 \times 10^{-2}$ ($r = 0.9986$), $Y_{\text{RBG}} = 8.4 \times 10^{-3} X - 3.8 \times 10^{-2}$ ($r = 0.9943$), 浓度范围分别为 7.4 ~ 277.6, 7.5 ~ 282.1, 7.0 ~ 262.6 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

在信噪比 $S/N = 10$ 的条件下, 血浆中 BL, CBG, RBG 最低定量浓度分别为 2.4, 1.5, 1.8 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.6 精密度 在 1.0 mL 空白血浆中分别精密加入不同浓度混和对照品溶液, 配制成含 BL (0.022, 0.074, 0.185 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), CBG (0.023, 0.075, 0.188 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), RBG (0.021, 0.070, 0.176 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 3 种成

分低、中、高各 3 种浓度的血浆样品 ($n = 5$), 按 2.3 项下操作后进样分析, 于日内和 5 d 内各测定 3 各浓度样品, 计算日内和日间精密度, 结果见表 1。表明 BL, CBG, RBG 的日内、日间精密度 RSD (%) 均 $< 10.0\%$, 准确度均在 91.3% ~ 103.4%。

2.7 回收率

2.7.1 方法回收率 在 1.0 mL 空白血浆中分别精密加入不同浓度混和对照品溶液, 配制成低、中、高 (0.022, 0.074, 0.185 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 3 种浓度的质控样品, 在同一日内取低、中、高 3 种浓度对照品血浆各 5 份, 按 2.3 项下操作后进样分析, 以当日当批回归方程计算 BL, CBG, RBG 浓度, 与加样浓度比较, 计算准确度 (方法学回收率), 结果见表 2。同时, 计算内标物质回收率为 92.7%。

2.7.2 萃取回收率 在 1.0 mL 犬空白血浆中分别精密加入不同浓度混和对照品溶液, 配制成低、中、高 (0.022, 0.074, 0.185 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 3 种浓度的质控样品各 5 份, 按 2.3 项下操作后进样分析, 以血浆中 BL, RBG 的峰面积与相应浓度混合对照品溶液中 BL, CBG, RBG 峰面积的比值计算出上述 3 种浓度的萃取回收率。结果 BL 低、中、高 3 个浓度的萃取回收率分别为 (103.3 ± 7.7)%、(97.4 ± 6.8)%、(99.7 ± 5.5)%; CBG 低、中、高 3 个浓度的萃取回收率分别为 (103.3 ± 4.9)%、(94.9 ± 3.8)%、(97.9 ± 3.0)%; RBG 高、中、低浓度 3 个浓度的萃取回收率分别为 (103.4 ± 5.9)%、(100.0 ± 4.4)%、(97.9 ± 4.6)%。

2.8 稳定性 在 1.0 mL 空白血浆中分别精密加入不同浓度混和对照品溶液, 配制成低、中、高 (0.022, 0.074, 0.185 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 3 种浓度的质控样品各 4 份, 分别于 4 °C 条件下存放 12, 24 h, 1 W, 和 -20 °C 存放 1 个月后测定。结果表明血浆中的 BL, CBG, RBG 在 4 °C 条件下存放 1 W 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 $< 15.0\%$ 的规定。

2.9 方法应用 取比格犬 6 只, 雌雄各半, 给药剂量为 0.18 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 蟾酥提取物 (20% 注射用无水乙醇生理盐水溶液溶解, 配制浓度为 0.4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 股静脉缓慢注射, 分别于给药前、给药后 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 min 于股静脉取血, 肝素抗凝, 经 5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 得样品血浆。采用本文所建立的 SPE-HPLC 方法测定犬血浆中 BL, CBG, RBG 浓度, 得血药浓度-时间数据, 经 Kinetic 4.4.1 软件非房室模型拟合, 得到犬在给药后的平均血药

表1 犬血浆中BL,CBG,RBG的日间、日内精密度的($\bar{x} \pm s$)

成分	质量浓度 /mg·L ⁻¹	日内精密度的(n=6)			日间精密度的(n=5)		
		测定浓度	准确度	RSD	测定浓度	准确度	RSD
		/mg·L ⁻¹	/%	/%	/mg·L ⁻¹	/%	/%
BL	0.022	0.023 ± 0.000 5	105.3	2.20	0.022 ± 0.002 0	100.2	9.16
	0.074	0.074 ± 0.000 7	100.6	0.88	0.073 ± 0.002 8	98.6	3.83
	0.185	0.185 ± 0.005 1	99.8	2.75	0.190 ± 0.006 0	102.6	3.27
CBG	0.023	0.022 ± 0.000 9	97.7	3.96	0.021 ± 0.001 5	93.4	7.24
	0.075	0.075 ± 0.001 9	98.5	2.51	0.070 ± 0.004 4	92.8	6.29
	0.188	0.173 ± 0.002 1	91.3	1.24	0.172 ± 0.002 0	91.3	1.16
RBG	0.021	0.022 ± 0.000 7	103.7	3.15	0.022 ± 0.000 7	103.4	3.18
	0.070	0.069 ± 0.002 0	97.9	2.88	0.072 ± 0.002 8	103.0	3.82
	0.176	0.170 ± 0.000 8	96.7	0.46	0.175 ± 0.008 0	99.7	4.73

表2 犬血浆中BL,CBG,RBG的回收率的($\bar{x} \pm s$)

成分	质量浓度 /mg·L ⁻¹	测定浓度 /mg·L ⁻¹	回收率 /%	RSD /%
BL	0.022	0.019 ± 0.000 5	87.2	2.63
	0.074	0.071 ± 0.000 6	95.9	0.85
	0.185	0.182 ± 0.004 3	98.4	2.36
CBG	0.023	0.022 ± 0.000 7	95.7	3.18
	0.075	0.073 ± 0.001 3	97.3	1.78
	0.188	0.176 ± 0.002 1	93.6	1.19
RBG	0.021	0.021 ± 0.001 1	100.3	5.24
	0.070	0.068 ± 0.002 2	97.1	3.24
	0.176	0.178 ± 0.001 7	101.1	0.96

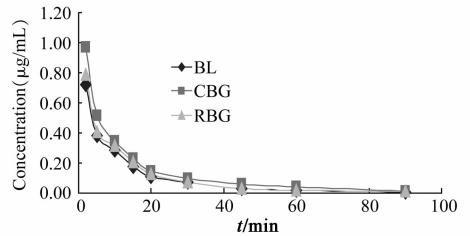


图2 BL,CBG,RBG犬血浆中的浓度-时间曲线(0.18 mg·kg⁻¹, $\bar{x} \pm s$, n=6)

浓度-时间曲线,见图2,得到主要药代动力学参数见表3。

3 讨论

3.1 生物样品的处理 曾尝试过仅采用乙腈沉淀蛋白与有机溶剂萃取相结合的方法,但此方法的回收率较低,由于样品较大对测定的存在较大干扰,且吹干的时间较长;经过大量筛选试验,最终确定采用乙腈沉淀蛋白后固相小柱萃取的方法对血样进行处

理,得到了较为满意的结果。

3.2 蟾毒甙类成分的代谢特性 本文建立了蟾酥脂溶性成分蟾毒灵、华蟾酥毒基、酯蟾毒配基在犬血浆中的HPLC测定法,并通过单次静脉给药对其在犬体内药代动力学进行了研究,得到上述3种成分的主要药代动力学参数及血药浓度-时间曲线。研究表明,方法操作简单、准确可靠;3种蟾毒甙类成分在犬体内代谢较为迅速,静脉给药90 min时,血浆中几乎检测不到,这与文献[4-9]中研究结果一致,表明此类成分在不同动物体内代谢均较为迅速。

3.3 蟾酥的药理作用及药剂学研究 蟾酥具有镇

表3 BL,CBG,RBG犬体内的药代动力学参数($\bar{x} \pm s$, n=6)

主要参数(单位)	数据		
	BL	CBG	RBG
C _{max} /mg·L ⁻¹	0.721 1 ± 0.04	0.968 1 ± 0.03	0.785 8 ± 0.02
T _{max} /min	2	2	2
T _{1/2} /min	28.77 ± 3.47	17.50 ± 0.56	14.86 ± 0.44
AUC ₀₋₉₀ /mg·L ⁻¹ ·min	8.79 ± 0.80	12.30 ± 0.67	9.66 ± 0.21
AUMC ₀₋₉₀ /mg·L ⁻¹ ·min ²	136.55 ± 20.03	213.98 ± 18.38	147.70 ± 4.55
MRT ₀₋₉₀ /min	20.17 ± 1.49	19.332 ± 0.56	16.50 ± 0.36

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以及毒性较强,使其静脉途径给药受到明显的制约。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制剂研究。本文的研究内容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、其他给药途径药代动力学以及相对生物利用度等方面的研究提供参考。

本研究所使用的蟾酥提取物中蟾酥灵、华蟾素毒基、酯蟾毒配基的含量以及比例经与提取前药材对比均较为一致。本课题的最终目的为采用得到的含有脂溶性成分较高的蟾酥提取物替代蟾酥药材,以达到成分明确、使用更加安全的目的,这对于这味毒性较大但功效明确、应用广泛的中药材具有较大的意义。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:376.
- [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.
- [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.
- [4] Cao Yang, Zhao Lvlong, Liang Qionglin, 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):227.
- [5] Zhang Yu, Tang Xing, Liu Xiaoliang, 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):224.
- [6] Yan Liang, Ai-hua Liu, Song Qin 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):442.
- [7] 杨勇, 奉建芳, 卢洁, 等. 蟾酥固体脂质纳米粒冻干制剂体内药代动力学研究 [J]. 中成药, 2006, 28(6):787.
- [8] 刘冬, 杜守颖, 何秀峰, 等. 蟾酥提取物中 2 种蟾蜍甾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.
- [9] 刘冬, 杜守颖, 何秀峰, 等. 蟾毒灵、华蟾酥毒基及酯蟾毒配基大鼠体内药代动力学研究 [J]. 中草药, 2012, 43(4):734.
- [10] 巩泉泉, 刘萍, 徐华雷, 等. HPLC 法测定大鼠血浆中去铁酮的含量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(2):271.

[责任编辑 顾雪竹]

天津中医药大学期刊编辑部 2014 年征订启事

《天津中医药》月刊, 每期 8 元, 年定价 96 元, 联系电话:022-59596310, 联系人:张震之。邮局订阅:邮发代号 6-83 电子邮件:zhongyiyao@vip.126.com, xuebaobj@126.com, 网址:http://www.tjzhongyiyao.com, 地址:天津市南开区鞍山西道 312 号, 邮政编码:300193。

《天津中医药大学学报》双月刊, 每期 6 元, 年定价 36 元, 联系电话:022-59596310, 联系人:张震之。邮局订阅:邮发代号 6-153, 电子邮件:xuebaobj@vip.126.com, xuebaotxd@126.com, 网址:http://www.tjzhongyiyao.com, 地址:天津市南开区鞍山西道 312 号, 邮政编码:300193。