

· 药物代谢 ·

痧药蟾酥丸中蟾酥的药代动力学研究

贾荷丽*, 姬诚, 郭万周

(南阳医学高等专科学校, 河南 南阳 473000)

[摘要] 目的: 进行痧药蟾酥丸 Beagle 犬急毒药代动力学研究。方法: 采用超高效液相色谱-飞行时间质谱(UPLC/TOF MS)建立 Beagle 犬血浆的代谢指纹谱, 测定 Beagle 犬空白组血浆、对照品、给药组血浆总离子流图谱, 并对给药血浆进行方法学验证和药代动力学研究。结果: 建立了 UPLC/TOF MS 方法测定 Beagle 犬血浆中的蟾酥二烯内酯类化合物, 成功地应用于 Beagle 犬灌胃给予蟾酥丸后血浆的药物动力学研究。结论: 本实验为痧药蟾酥丸安全性评价提供了化学依据, 为痧药蟾酥丸的临床应用提供参考。

[关键词] 痧药蟾酥丸; 蟾酥二烯内酯; 药代动力学; Beagle 犬

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0156-04

Pharmacokinetics of Bufadienolide in Shayao Chansu Pill

JIA He-li*, JI Cheng, GUO Wan-zhou

(Nanyang Medical College, Nanyang 473000, China)

[Abstract] **Objective:** To study pharmacokinetics of bufadienolide in Shayao Chansu pill in beagle dogs. **Method:** Plasma metabolic fingerprint in Beagle dogs was established with UPLC/MS-TOF. The total ion chromatograms in blank plasma, plasma containing control products and plasma obtained from dogs taken Shayao Chansu pill were determined. The plasma containing bufadienolide was methodologically validated and pharmacokinetic study was carried out. **Result:** The UPLC/MS-TOF method for determining bufadienolide in the Beagle plasma was established, and successfully applied to the pharmacokinetic studies for Beagle plasma after administration of Shayao Chansu pill. **Conclusion:** The studies provided chemical evidence for safety evaluation of Shayao Chansu pill and references for clinical application of the pill.

[Key words] Shayao Chansu pill; bufadienolide; pharmacokinetics; Beagle dog

痧药蟾酥丸来自《中药成方配本》苏州方, 治中暑触秽、腹痛吐泻。蟾酥为蟾蜍科动物中华大蟾蜍或黑眶蟾蜍等的耳后腺分泌的白色浆液经加工干燥而成的固体物。其化学成分复杂, 含有几十种蟾蜍毒素类化合物^[1]。蟾蜍毒素类化合物既是蟾酥的有效成分, 又是其毒性成分, 如长期或过量服用可出现循环、消化及神经系统等中毒症状。虽然人们对蟾酥毒性早有认识, 但目前研究主要集中在蟾酥的化学成分分析及药理作用^[2], 而对蟾酥的毒性作

用机制仍不清楚。另外, 因为蟾酥提取物对血管有刺激性不良反应, 在临床应用过程中常出现静脉输注不畅、输液部位红肿、静脉内疼痛等静脉损伤症状, 限制了其在临床的应用。本文以经蟾酥干预的 Beagle 犬为研究对象, 以超高效液相色谱飞行时间质谱(UPLC/TOF MS)建立了血清的代谢指纹谱, 本研究采用 UPLC-TOF MS 建立了痧药蟾酥丸中 3 种蟾酥二烯内酯类化合物的定量分析方法, 并得到了其中 2 种化合物的药代动力学参数, 为痧药蟾酥丸安全性评价提供化学依据, 为痧药蟾酥丸的临床应用提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 series UPLC/TOF-MS

[收稿日期] 20120321(259)

[通讯作者] * 贾荷丽, 主管中药师, 从事中药制剂与分析, Tel:0377-63529370, E-mail:jiaheli66@126.com

(Agilent Corp), Sartorius BP211D 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司], Millipore Q 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂 甲醇(色谱纯, Merck), 乙腈(色谱纯, Baker), 水为超纯水, 蟾毒灵、华蟾酥毒基(DELTA 天然有机化合物信息中心), 脂蟾毒配基(中国药品生物制品检定所), 痧药蟾酥丸(郑州市第一人民医院药剂科自制, 20090904)。

1.3 动物 Beagle 犬 12 只, 体重(6~8) kg, 雌、雄各半, 由北京玛斯生物技术有限公司提供, 许可证号 SCXK(京)2009-0002。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Acquity™ BEHC₁₈ 反向分析柱(100 mm × 2.1 mm, 3.5 μm, Waters)。流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱 0~3 min, 5%~50% B, 3~20 min, 50%~95% B, 20~22 min, 95% B, 22~23 min, 95%~5% B, 23~25 min, 5% B, 流速 0.4 mL·min⁻¹, 柱温 50 °C, 检测波长 296 nm。

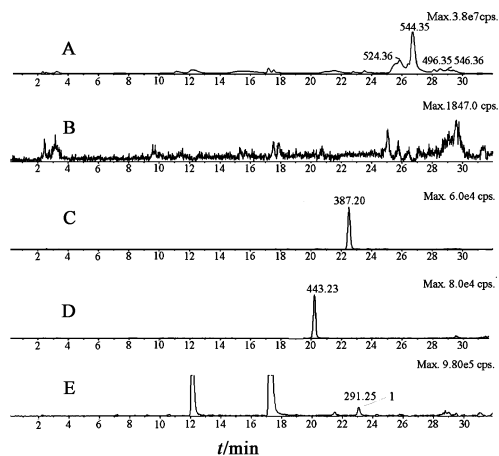
2.2 质谱条件 质谱分析采用“W-”模式, 脱溶剂气流量 750 L·h⁻¹, 脱溶剂气温度 350 °C, 锥孔气流量 40 L·h⁻¹, 离子源温度 120 °C, 毛细管电压 2 500 V, 锥孔电压 50 V, 微通道板电压 2 300 V。质谱图平均扫描速率 0.1 s, 锁定质量校准选择“DRE”模式, 以亮氨酸脑啡肽进行实时精确质量校正(m/z : 5542615 [M-H]⁻)作为质量校准峰, 质量扫描范围 m/z 50~1 500。

2.3 血浆样品的处理 取血浆 800 μL, 加入 5α-二羟基睾酮内标溶液(300 μg·L⁻¹) 40 mL, 混匀。在上述混合液中加入 3 mL 甲醇, 涡旋 2 min, 然后在 3 000 r·min⁻¹ 下离心 10 min。将上清液转移至 PV 管中。上清液上样至依次用 1 mL 甲醇和 1 mL 超纯水活化处理的 HLB 固相萃取小柱。依次用 1 mL 50% 甲醇和含有 1 mL 2% 氨水的 50% 甲醇冲洗后, 再用 1 mL 含有 1% 甲酸的甲醇洗脱, 洗脱液在 40 °C 下氮气吹干, 残渣用 100 μL 流动相溶解 0.1% 甲酸水溶液-乙腈(2:3), 并在 4 °C 下保存备用。样品进样前在 5 000 r·min⁻¹ 下离心 10 min。

2.4 血浆样品的采集 雌、雄 Beagle 犬各 6 只, 5 月龄, 体重 6~8 kg。给药方案: 采用积累剂量, 预计 6 个给药剂量点(0.2, 0.6, 1.8, 5.4, 16.2, 48.6 mg·kg⁻¹), 每个剂量点结束后消除 48 h 后给予下 1 个剂量, 最低剂量点为临床用药剂量。给药前禁食不禁水 12 h, 按给药量以 1% 羟甲基纤维素钠(CMC-

Na) 溶液配制成相应浓度的混悬液, 给药前摇匀, 按照不同浓度等体积 ig 给药, 蟾酥提取物的最低给药剂量经临床剂量换算得到^[3]。给药后 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 min, 1, 2, 3, 4, 6 h, 每个点取全血 1.5 mL。给药 2 h 后, 取肝门静脉血, 血样取出后置于 -20 °C 以下保存。

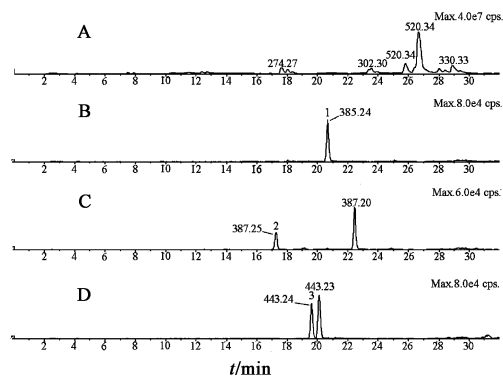
2.5 被分析物鉴定 空白血浆的代表性色谱图如图 1 所示。B, C, D 表示分子离子峰为 385.24, 387.25 和 443.24 Da 的内源性物质, E 表示 I. S. (内标溶液) 在 291.25 Da 下的提取离子流图(nominal mass chromatograms)。



A. 空白; B. 385.24 Da; C. 387.25 Da; D. 443.24 Da; E. 291.25 Da 提取离子流图。图中 1 为加入的 I. S. 峰

图 1 HPLC/TOF MS 测定的空白血浆总离子流(TIC)

上述内源性物质具有与二烯内酯类化合物相似的分子离子峰, 因此有必要对其进行进一步的鉴定以区别被分析物。对这些内源性物质进行扫描以给出精确提取离子流图(AMC), 并用分子式计算器计算。通过这种方法可以进一步区分被分析物与内源性物质。



A. 对照; B. 385.24 Da; C. 387.25 Da;

D. 443.24 Da 的提取离子流(图 4 同)

图 2 加入二烯内酯类对照品的血浆的代表性提取离子流

图 2 表示加入二烯内酯类品的血浆的代表性提取离子流图,脂蟾毒配基 (m/z 385.24 Da)、蟾毒灵 (m/z 387.25 Da) 和华蟾毒配基 (m/z 443.24 Da) 的保留时间分别为 20.7, 17.2, 19.6 min。

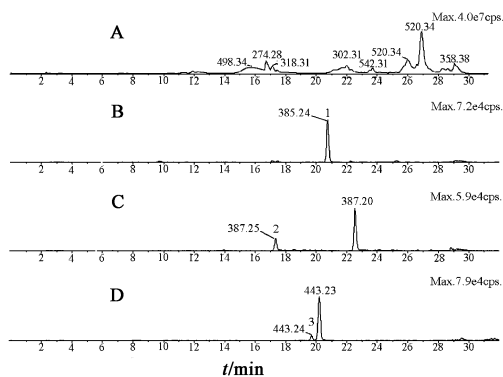


图 3 给药血浆的代表性提取离子流图 (TIC)

2.6 线性关系考察 分别量取空白血浆 0.3 mL 8 份,精密加入不同浓度的对照品混合溶液使血浆中脂蟾毒配基、蟾毒灵和华蟾毒配基质量浓度为 0.018 1, 0.037 4, 0.075 2, 0.149, 0.37, 0.941, 1.88, 3.76 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品血浆,按 2.3 项下操作后分析。以横坐标为浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),纵坐标为该化合物的峰面积 (mAu) 进行标准曲线绘制,得到脂蟾毒配基 (m/z 385.24 Da)、蟾毒灵 (m/z 387.25 Da) 和

华蟾毒配基 (m/z : 443.24 Da) 的标准曲线分别为:
 $Y = 0.0954X + 0.4579$; $Y = 0.0767X + 0.2157$ 和
 $Y = 0.1666X + 1.0937$ 。相关系数 (r) 分别为 0.998 3, 0.998 7 和 0.998 8 ($n = 6$)。

2.7 精密度试验 方法精密度和准确度是由质量浓度分别为 1.0, 15.0, 90.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的加样血浆获得的,加样血浆的制备方法和处理方法按 2.3 项下。日内精密度是通过测定不同质量浓度水平 ($n = 6$) 在 1 d 内的精密度和准确度。日间精密度是通过测定不同质量浓度水平的样品在连续 3 d 内的精密度和准确度。在测定期间,UPLC-MS 系统不停机连续工作 3 d。日内精密度为 3.87% ~ 6.43%,准确度为 88.67% ~ 100.4%。日间精密度 < 7.39%,日间准确度为 88.74% ~ 98.49%。日间和日内精密度和准确度测定结果如表 1 所示。

2.8 回收率试验 制备加样血浆浓度分别为 1.0, 15.0, 90.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n = 3$),按照 2.3 项下方法制备血浆样品并测定。回收率 (萃取回收率) 的计算方法如下,比较相同浓度水平的被分析物在加样血浆和对照品溶液中的峰面积。含有 1.0, 15.0, 90.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 二烯内酯类的血浆方法回收率分别高于 84.54%, 85.78% 和 87.47% ($n = 3$),并且 RSD 分别低于 6.81%, 4.32%, 6.08% ($n = 3$) (表 2)。

表 1 加样血浆中蟾酥二烯内酯类的日间和日内精密度测定 ($\bar{x} \pm s$)

样品质量浓度 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	检测物质	日内准确度和精密度 ($n = 6$)			日间准确度和精密度 ($n = 3$)		
		测得质量	精密度	准确度	测得质量	精密度	准确度
		浓度 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD /%	RSD /%	浓度 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD /%	RSD /%
1.0	脂蟾毒配基	0.95 ± 0.07	5.20	97.77	0.76 ± 0.05	6.86	88.74
	蟾毒灵	1.04 ± 0.04	6.43	100.4	0.94 ± 0.06	6.35	93.08
	华蟾毒配基	0.93 ± 0.06	4.74	99.25	0.96 ± 0.11	6.84	98.49
15.0	脂蟾毒配基	14.58 ± 0.82	5.35	98.22	13.45 ± 0.45	6.04	92.39
	蟾毒灵	14.14 ± 0.60	4.74	88.67	14.75 ± 0.54	4.82	93.81
	华蟾毒配基	14.37 ± 0.69	4.46	93.99	14.64 ± 1.03	7.39	95.05
90.0	脂蟾毒配基	90.14 ± 3.48	3.87	100.6	86.63 ± 2.43	3.94	96.32
	蟾毒灵	89.49 ± 3.27	4.79	99.29	86.23 ± 2.46	3.78	95.80
	华蟾毒配基	84.42 ± 3.32	4.27	93.74	86.75 ± 3.43	4.73	96.45

2.9 稳定性试验 含有蟾酥二烯内酯类的血浆样品的稳定性是通过测定 3 个不同质量浓度水平 (1.0, 15.0, 90.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的加样血浆实现的。样品处理方法和分析方法同 2.3。分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 测定被分析物的浓度与 0 h 浓度的比值。脂蟾毒配基为 97.34% ~ 99.75%, RSD 2.71% ($n = 3$), 蟾毒灵为 96.27% ~ 100.4%, RSD 3.82% ($n = 3$), 华蟾毒配基为 98.18% ~ 100.2%, RSD 3.17%

($n = 3$), 结果表明 3 种蟾酥二烯内酯类的血浆样品 24 h 内稳定。

2.10 Beagle 犬给与痧药蟾酥丸的药物动力学研究
对空白组、痧药蟾酥丸全方组的水浆样品进行蟾酥二烯内酯类化合物测定,即 10 只 Beagle 犬 × 10 个时间点 × 6 个剂量 = 600 份样品按照样品处理项下进行处理,测定结果表明在现有测定条件下,仅能测到第 5 个剂量 (16.2 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的部分高浓度时间

表2 加样血浆回收率测定($n=3$)

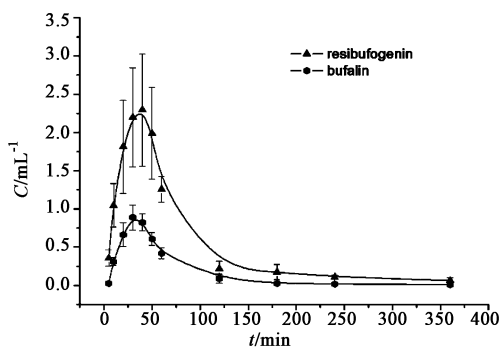
加样量 $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	检测物质 $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	平均回收率 $/\%$	RSD $/\%$
1.0	脂蟾毒配基	85.27	6.81
	蟾毒灵	84.54	3.29
	华蟾毒配基	93.24	5.47
15.0	脂蟾毒配基	88.65	4.32
	蟾毒灵	85.85	3.98
	华蟾毒配基	85.78	4.31
90.0	脂蟾毒配基	89.86	3.76
	蟾毒灵	88.53	4.45
	华蟾毒配基	87.47	6.08

点和第6个剂量($48.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)的全部时间点下药物浓度。在样品处理过程中样品被浓缩8倍,但是最高浓度点仅为 $10.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右。

本研究建立的 HPLC/TOF MS 方法适用于测定 Beagle 犬血浆中的蟾酥二烯内酯类化合物,并可以被成功地应用于 Beagle 犬灌胃给予痧药蟾酥丸后血浆的药物动力学研究。蟾酥二烯内酯类的血浆平均药时曲线如图4所示,药动学数据如表3所示。

表3 比格犬 ig 痧药蟾酥丸 $48.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后脂蟾毒配基和蟾毒灵的药动力学参数($\bar{x}\pm s, n=6$)

药动学参数	脂蟾毒配基	蟾毒灵
$\text{AUC}_{0-1}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	160.57 ± 21.34	55.55 ± 7.55
$\text{AUC}_{0-\infty}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	163.33 ± 21.98	55.72 ± 7.47
$C_{\text{max}}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	2.35 ± 0.71	0.91 ± 0.15
$t_{\text{max}}/\text{min}$	38.33 ± 4.08	33.33 ± 5.16
$t_{1/2\alpha}/\text{min}$	20.74 ± 5.89	25.45 ± 13.28
$t_{1/2\beta}/\text{min}$	35.30 ± 12.65	32.11 ± 11.99

图4 比格犬 ig 予痧药蟾酥丸 $48.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后脂蟾毒配基和蟾毒灵的药时曲线($\bar{x}\pm s, n=6$)

3 讨论

中药作为巨复杂体系,其药效是多种成分协同作用的结果,在生物体环境中分布消除后,浓度通常较低,这是中药代谢研究中的难点之一。特别是蟾酥二烯内酯类化合物研究相对缺乏,为了控制药物质量,一般采用 HPLC 方法^[4],因血浆样品杂质干扰大,易产生误差限制了其使用。UPLC-MS 以其灵敏

度高、适用性广的特点,为中药代谢研究开辟了全新的领域^[5]。蟾酥二烯内酯类化合物是痧药蟾酥丸中的药效成分同时也是毒性成分^[6],本研究采用 UPLC-TOF MS 建立了痧药蟾酥丸中3种蟾酥二烯内酯类化合物的定量分析方法,出峰时间快,方法简便迅速,重复性好,并得到了其中2种化合物的药代动力学参数,为痧药蟾酥丸安全性评价提供化学依据,为痧药蟾酥丸的临床应用提供参考。

有专家^[7]在研究蟾酥对心脏的活性时发现尽管蟾酥对心脏产生的作用十分显著,但是这种作用是短促的,上述实验结果表明蟾酥二烯内酯类的 $t_{1/2\alpha}$ 和 $t_{1/2\beta}$ 为 $10\sim 40\text{ min}$,并且 C_{max} 在 30 min 左右出现,这一结果表明蟾酥二烯内酯类可以作为评价蟾酥丸临床应用的标记物。本方法提供了研究蟾酥丸在体内动态变化的思路,并为蟾酥丸 PK-PD 研究提供了可靠的保障。

此外,在 Beagle 犬给予蟾酥丸的血样中也测到了华蟾毒配基(cinoufagin m/z 443.24 Da),但是华蟾毒配基在体内消除很快, 30 min 时即已经无法检测并且浓度很低,因此按照传统的一室或二室模型无法得到药动学参数。

【参考文献】

- [1] 吴喜燕,高慧敏,王智民. 蟾蜍类药材化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(14):207.
- [2] Liang Y, Liu A H, Qin S, et al. Analytical approaches for the detection of epoxides and hydroperoxides in active pharmaceutical ingredients, drug products and herbals [J]. J Pharmaceut Biomed, 2008, 46: 442.
- [3] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学,2004, 9(9):1069.
- [4] 刘冬,杜守颖,何秀峰,等. 蟾酥提取物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.
- [5] Taylor J, King R D, Altmann T, et al. Application of metabolomics to plant genotype discrimination using statistics and machine learning [J]. Bioinform, 2002, 18:241.
- [6] 宋长城,吕祥. 蟾毒灵抗肿瘤作用及其分子机制研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2010,18(9):1863.
- [7] K K Chen, A Kovarikova. Pharmacology and toxicology of toad venom [J]. J Pharm Sci, 1967, 56(12):1535.

【责任编辑 何伟】