

基于化学发光法的禹州漏芦光毒性评价

戴玮^{1,2}, 刘勇^{1,2}, 刘永刚^{1,2}, 翟文文^{1,2}, 乔延江^{1,2*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102;
2. 北京中医药大学中药基础与新药研究北京市重点实验室, 北京 100102)

[摘要] **目的:**建立化学发光检测药物光毒性的方法,对禹州漏芦提取物进行光毒性评价。**方法:**将还原型辅酶 I 二钠盐与待测物混合后置于长波紫外线(UVA)光源下照射一定剂量后加入鲁米诺,计数发光值,以发光值反映光毒性强度。**结果:** α -三联噻吩的发光值与照射剂量有关,在 $1.0 \times 10^{-9} \sim 2.5 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 存在量效关系,禹州漏芦提取物在高浓度时,所含的有色物质会对荧光产生屏蔽效应,在使用本方法时应将提取物溶液进行适当稀释。**结论:**方法操作简单、灵敏度高,可以用于药物光毒性的前期筛选。

[关键词] 光毒性; 化学发光法; α -三联噻吩; 禹州漏芦

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0185-03

Phototoxicity Assessment of Radix Echinopsis based on Chemiluminescence Method

DAI Wei^{1,2}, LIU Yong^{1,2}, LIU Yong-gang^{1,2}, ZHAI Wen-wen^{1,2}, QIAO Yan-jiang^{1,2*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. Beijing Municipal Key Laboratory for Basic Research of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a test model for phototoxic chemicals with the method of chemiluminescence and assess the phototoxicity of different components of Radix Echinopsis. **Method:** Nicotinamide adenine dinucleotide reduced (NADH) and photosensitive agents was irradiated with ultraviolet A (UVA), then luminol was added to the test samples, and chemiluminescent value was counted and calculated by an ultra weak chemiluminescence analyzer. **Result:** Chemiluminescent values of the α -terthienyl concerned with the increase of UVA dosage, and there was a dose-effect relationship in the concentration range of $1.0 \times 10^{-9} \sim 2.5 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion:** This method is simple, accurate and sensitive. It can be used for pre-assessment of phototoxicity.

[Key words] phototoxicity; chemiluminescence; α -terthienyl; Radix Echinopsis

光毒性是指药物吸收紫外光能量后在皮肤中释放导致的皮肤损伤,即皮肤或全身接触或应用化学物质后经紫外线照射所引起的一种皮肤毒性反应。临床上报道多种药物都具有光毒性,其中也包括补

骨脂、白芷、蛇床子等常用中药^[1-2]。禹州漏芦味苦、性寒,归胃经,具有清热解毒、排脓止血、消痈下乳的功效,一般用于诸疮痈肿、乳痈肿痛、乳汁不通、瘰疬疮毒等症。禹州漏芦中含有大量噻吩类化合物,其中 α -三联噻吩是主要的指标性成分。有研究表明 α -三联噻吩结构中所含的不饱和共轭链具有光敏活性,可导致光毒反应^[3],这使禹州漏芦的使用存在用药安全隐患。本研究采用体外化学发光法,以 α -三联噻吩建立光毒性评价方法,并对禹州漏芦不同极性提取物的光毒性进行了量化评价,旨在建立光毒性筛选方法,为安全合理的使用禹州漏芦提供理论依据。

[收稿日期] 20111104(006)

[基金项目] 北京中医药大学自主选题项目(JYBZZ-XS023)

[第一作者] 戴玮, 硕士, 从事中药药效物质基础研究, Tel: 13699269586, E-mail: daiwei@iccas.ac.cn

[通讯作者] * 乔延江, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药质量控制、中药新药研究与开发、中药信息学研究, Tel: 010-84738620, E-mail: yjqiao@263.net

1 材料

禹州漏芦于 2011 年 5 月购自宁波,由北京中医药大学刘春生教授鉴定为菊科蓝刺头属植物蓝刺头 *Echinops latifolius* Tausch. 或华东蓝刺头 *E. grijsii* Hance. 的干燥根,标本保存于北京中医药大学。本实验所用试剂除特别注明外均为分析纯,水为超纯水。 α -三联噻吩为实验室自制(纯度 $\geq 98\%$)。 $1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 鲁米诺储备液:取 17.6 mg 鲁米诺(Sigma)于 10 mL 量瓶中, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液定容,摇匀,使用时用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液稀释至所需浓度。 $1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 还原型辅酶 I 二钠盐(NADH)储备液:取 35.47 mg 还原型辅酶 I 二钠盐(阿拉丁)于 5 mL 量瓶中,加水定容,摇匀,使用时用水稀释至所需浓度。

BPCL 微弱发光测量仪(中国科学院生物物理研究所),UVA 光源(北京炳洋科技有限公司),岛津高效液相色谱仪(包括四元泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器)。

2 方法与结果

2.1 光毒性评价方法的建立

2.1.1 发光动力学曲线 光敏物质吸收光子能量,使氧分子与 NADH 反应,产生氧化型辅酶 I 和活性氧,活性氧与鲁米诺反应,生成激发态的二价阴离子氨基酸酸盐(APD),APD 经非辐射性跃迁回到基态,释放出光子,由微弱发光测量仪经光子计数、数据处理等过程,得到发光值^[4]。发光值与光敏物质的量成一定量效关系。测试步骤为:在反应池中加入 α -三联噻吩 200 μL 和 NADH 200 μL ,混合均匀后 UVA 光源照射 60 min,加入鲁米诺 100 μL ,记录发光值,得到发光动力学曲线。同时,固定其他条件,不以 UVA 光源照射,记录发光值,得到暗室对照发光曲线。固定其他条件,以乙醇代替 α -三联噻吩溶液,记录发光值,得到空白对照发光曲线。如图 1 所示。

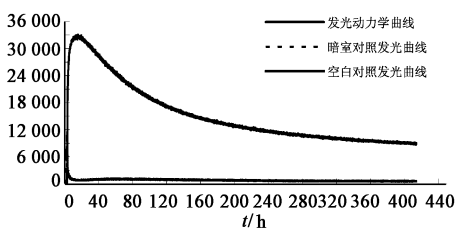


图 1 α -三联噻吩-NADH-鲁米诺体系化学发光动力学曲线

2.1.2 照射时间考察 在固定其他条件的情况下,分别在照射 5, 10, 20, 40, 60, 80, 120 min 后,测量发光值,考察照射时间对发光值的影响,以发光动力学曲线峰值为发光值。结果显示:发光值随照射时间

增加而增加,在 60 ~ 80 min 时最高,120 min 时明显减弱,故选择照射 60 min。

2.1.3 鲁米诺浓度考察 固定其他条件,在 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 比较鲁米诺浓度对发光值信号的影响,当 NADH 摩尔浓度为 $5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, α -三联噻吩为 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,照射 60 min 时,随着鲁米诺浓度增加,发光值信号随之增加。为了得到较高信号响应,选择鲁米诺摩尔浓度为 $1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.1.4 NADH 浓度考察 在鲁米诺摩尔浓度为 $1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, α -三联噻吩 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,照射时间 60 min 时,比较 NADH 浓度对发光值信号的影响,在 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时当 NADH 浓度增加,发光值信号逐渐增加,在 $5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时信号最大,故选择 NADH 摩尔浓度为 $5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.1.5 稳定性考察 在优化条件下,配制 5 份 NADH 和 α -三联噻吩混合液,照射 60 min 后同时取出,每隔 2 min,取一份混合液加入鲁米诺溶液,测量最大发光值。5 次测量结果 RSD 2.07%,表明在离开紫外光源照射后 10 min 内测量,其发光值稳定。

2.1.6 量效关系考察 在优化条件下,考察 α -三联噻吩质量浓度在 $1.0 \times 10^{-9} \sim 2.5 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 发光值与浓度间关系,在此范围内 α -三联噻吩与发光值正相关。

2.2 不同极性提取物中 α -三联噻吩的含量测定

2.2.1 色谱条件 Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1% 醋酸溶液(85:15),流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 352 nm,柱温室温^[5]。

2.2.2 含量测定 取禹州漏芦粉末(50 目)每份 10 g 共 6 份,分别用 90%, 70%, 50%, 30%, 10% 乙醇和水超声提取,过滤,蒸干溶剂,加甲醇配制成 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液。采用 2.2.1 色谱条件,测定不同极性提取物中 α -三联噻吩含量,其中 30% 乙醇提取物、10% 乙醇提取物、水提取物中均未检出 α -三联噻吩,而其余样品测定结果显示,随着提取溶剂极性增加, α -三联噻吩含量明显降低。90% 乙醇提取物、70% 乙醇提取物、50% 乙醇提取物中 α -三联噻吩质量分数分别为 1.38%, 0.55%, 0.11%。

2.3 禹州漏芦提取物的光毒性评价 将 2.2.2 中 90% 乙醇提取物、70% 乙醇提取物及 50% 乙醇提取物分别配制成 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液,采用 2.1 中建立的方法,测量其发光值。结果显示,在样品浓度较高时,发光值结果与空白相似,远远低于与之相应浓度的 α -三联噻吩纯品。推测样品浓度较高时,虽然 α -三

联噻吩含量较高,但是溶液中其他成分对光的吸收和释放均会产生一定影响,限制了该方法的应用。化学发光法作为痕量分析方法,样品检测限较低,为了能够得到准确的发光值信号,降低背景对测量的干扰,在实验中需要将样品稀释至较低浓度。

将 2.2.2 中 90% 乙醇提取物、70% 乙醇提取物及 50% 乙醇提取物分别配制成 α -三联噻吩质量浓度为 $1 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液,采用 2.1 中建立的方法,测量此 3 种溶液及质量浓度为 $1 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ α -三联噻吩溶液的发光值。结果显示, α -三联噻吩溶液的发光值最高,随着提取溶剂极性增加,样品发光值相应减弱。

3 讨论

《人用药品注册技术要求国际协调会议指南》和《FDA 光安全性检测指南》草案中建议以药物的光化学性质来判断是否对其进行光安全性实验,也就是说以药物是否吸收紫外线或可见光作为判断是否进行光安全性实验的标准。目前的评价光毒性的体外实验包括以光毒性筛查为目的的 3T3 成纤维细胞中性红摄取法^[6-7]、人三维皮肤模型光毒性实验及以光毒性机制研究为目的的红细胞溶血实验、组氨酸光氧化实验等^[8-9]。这些方法费用昂贵,操作复杂且实验条件要求较高。体外化学发光法是将还原型辅酶 I 二钠盐与待测物混合置于 UVA 光源下,照射一定剂量后加入化学发光剂鲁米诺,记录发光值,以发光值反映光毒反应的强度。化学发光是将化学反应产生的化学能转化为光能的反应过程,由于发光强度与光照剂量、被测物结构、浓度间存在一定内在联系,所以本方法可以反映药品的光化学性质,而且本方法费用较低、操作简单,可以应用于判断是否进行光安全实验的前期筛选。

我国的中草药有悠久的应用历史,在研究中发现某些中药中所含的化学成分可以导致光毒反应,如:补骨脂中的补骨脂素、贯叶连翘中的金丝桃素、白芷中的欧前胡内酯等。噻吩类成分是禹州漏芦中主要的脂溶性成分,此类成分大多含有 1~3 个噻吩环,环与环间通过 α -碳原子相连,且带有含炔基的侧链,是植物中的天然光敏剂^[10]。特别是具有较强光敏作用的 α -三联噻吩,已被证明存在于多种菊科植物中,其中也包括一些药用植物,这使此类植物在应用时存在导致光毒性的风险,应引起重视,合理使用。

3.3 提取物中成分复杂,虽然在浓度较高时所含的光敏物质浓度较高,但是受其他成分的影响,发光图与空白近似。当提取物浓度稀释至一定比例后,其

他成分含量降低,而化学发光法作为痕量分析方法,在光敏物浓度较低时,仍有较强发光信号。在使用化学发光法评价混合物光毒性时,应采用稀溶液,避免出现假阴性结果。

将禹州漏芦不同极性提取物配制成含有 $1 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ α -三联噻吩的溶液后,测量其发光值,结果显示提取物发光值均低于 α -三联噻吩纯品且随着提取溶剂极性降低,发光值明显升高。推测是由于提取物中其他成分对荧光产生了屏蔽效应,同时禹州漏芦中含有的其他噻吩类成分也具有一定光敏作用,随着提取溶剂的变化,组成与含量相应改变,导致发光值出现差异。

本方法从光毒反应机制出发评价药物是否存在产生光毒的可能性,而药物在应用过程中影响因素较多,因此仅用于药物光毒性的前期筛选,对于药物在实际应用中是否会导致光毒反应则需要结合动物实验来进一步验证。

[参考文献]

- [1] 王广进,张福仁. 药物诱发的光敏反应[J]. 中国中西医结合皮肤性病杂志,2009,8(2):131.
- [2] 王永辉,周然,李艳彦,等. 蛇床子超临界提取物的皮肤毒理学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(12):38.
- [3] 汪毅,李锐,张鹏. 禹州漏芦化学成分及药理活性的研究进展[J]. 中草药,2005,36(2):309.
- [4] YAN Chunlin, LIAO Kanghuang, HU Yue, et al. Quantitative *in vitro* assessment of drug phototoxicity by a chemiluminescence method[J]. Chin Med J,1999,112(6):501.
- [5] 李喜凤,余云辉,胡春月,等. HPLC 测定不同产地禹州漏芦中 α -三联噻吩含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):60.
- [6] Mark H Kleinman, Mark D Smith, Edit Kurali, et al. An evaluation of chemical photoreactivity and the relationship to phototoxicity [J]. Regulatory Toxicol Pharmacol,2010,58:224.
- [7] Anthony M Lynch, Phillip Wilcox. Review of the performance of the 3T3 NRU *in vitro* phototoxicity assay in the pharmaceutical industry [J]. Exper Toxicologic Pathology,2011,63:209.
- [8] 郑燕华,吕京. 化学物质的光毒性及其检测方法概述[J]. 国外医学:卫生学分册,1997,24(2):82.
- [9] 刘丽,孙立,李波. 药物非临床光安全性检测方法[J]. 中国药理学杂志,2010,45(12):884.
- [10] 汪毅. 禹州漏芦化学成分及其生物活性研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2007.

[责任编辑 邹晓翠]