

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

刘冬^{1,2}, 杜守颖^{1*}, 何秀峰², 王爱国², 李娜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: 建立兔血浆中 2 种蟾蜍甙烯类化合物蟾毒灵及酯蟾毒配基的分析方法, 探讨其在兔体内的药代动力学过程。方法: 兔按 $0.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 由耳缘静脉注射蟾酥提取物后分别于 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 min 心脏取血, 采用乙腈沉淀白与液液萃取相结合方法进行血浆样品预处理, 以 HPLC 测定兔血浆中蟾毒灵及酯蟾毒配基的浓度, 以 Kinetica 软件拟合药动学参数。结果: 建立的 HPLC 方法, 蟾毒灵、酯蟾毒配基均得到很好的分离, 达到体内分析要求。经非房室模型拟合, 得到了蟾毒灵、酯蟾毒配基在兔体内主要药动学参数。结论: 建立的蟾毒灵、酯蟾毒配基血药浓度测定方法及所获得的药动学参数, 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; 兔

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0135-04

[DOI] CNKI;11-3495/R. 20110906. 1107. 004 **[网络出版时间]** 2011-09-06 11:07

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110906.1107.004.html>

Studies on Simultaneous Determination and Pharmacokinetics of Two Bufadienolides in Rabbits Plasma

LIU Dong^{1,2}, DU Shou-ying^{1*}, HE Xiu-feng², WANG Ai-guo², LI Na²

(1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing Union
Pharmaceutical Factory, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the assay of bufalin (BL), resibufogenin (RBG) and study the pharmacokinetics of BL, RBG in rabbits plasma. **Method:** The sample blood from rabbits were injected venenum bufonis extract by $0.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ at 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 min. Protein precipitation with acetonitrile and liquid-liquid extraction was applied to purify plasma samples and used HPLC to determine the concentration of BL, RBG in it. The pharmacokinetics parameters were accessed by Kinetica software. **Result:** In this HPLC method, the separation, precision and accuracy of BL, 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 15.0% ($n=5$). The main pharmacokinetics parameters were fitted by non-compartment models. **Conclusion:** The HPLC method can be used to determine the concentration and to investigate the pharmacokinetics of BL and RBG.

[Key words] venenum bufonis extract; bufadienolides; pharmacokinetics; rabbits

[收稿日期] 20110623(010)

[基金项目] “重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-008;2009ZX09308-003);教育部博士点基金(20090013110007);国家自然科学基金课题(81073057)

[第一作者] 刘冬, 博士研究生, 助理研究员, 研究方向: 药物新剂型、体内药物分析, Tel:010-83165745, E-mail: imldld@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 杜守颖, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药新剂型与制剂关键新技术, Tel:010-84738615, E-mail: dushouying@263.net

蟾酥为中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *B. melanostictus* 的耳后腺分泌的白色浆液,经加工干燥制成^[1],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。蟾酥中的主要成分有蟾蜍甙二烯类、强心甙烯蟾毒类、吲哚碱类、醇类及多糖、氨基酸、肽类以及肾上腺素等。蟾酥药理活性较强,作用广泛,已引起国内外的广泛关注。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(总和约占 10%),对于心血管系统、肿瘤细胞均有显著的药理活性,其通过多种抗肿瘤途径与机制,具有显著的抗肿瘤疗效^[2-3]。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 种蟾蜍甙烯类成分的组合物;三者所占比例固定,总量占总质量 95% 以上。

蟾酥毒性较大,故该研究提取物体内药代动力学有极为重要的意义。目前,蟾蜍甙烯类成分血药浓度测定方法有 HPLC-MS, SPE-HPLC 等^[4-6],其所用动物为大鼠或比格犬,研究对象一般为蟾酥粗提物或成方(六神丸),目前未见此类成分在兔体内的药代动力学研究。本文通过参考相关文献^[7-9],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,建立了兔血浆中蟾毒灵及酯蟾毒配基的 HPLC 测定法,并将该法用于 6 只新西兰兔单剂量静脉注射蟾蜍甙烯类化合物的药代动力学研究。

1 材料

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), AW120 型电子分析天平(日本岛津), Vortex-2 型涡旋混合机(美国 Scientific Industrious), HC-2064 型高速离心机(科大创新有限公司), Kinetica 4. 4. 1 软件(Inna Phase Co.)。

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; 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所批号分别为 803-9202, 0718-9306, 10171-0102), 蟾毒灵对照品(天津马克生物有限责任公司), 蟾酥(购自北京闫村蟾蜍养殖基地, 经粉碎后过 65 目筛), 蟾酥提取物(经提取、纯化工艺制得, 其中 3 者所占比例固定, 总含量 95% 以上)。

新西兰兔 6 只, 体重 2. 2 ~ 2. 7 kg, 雌雄各半, 由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)2008-0009。

2 方法与结果

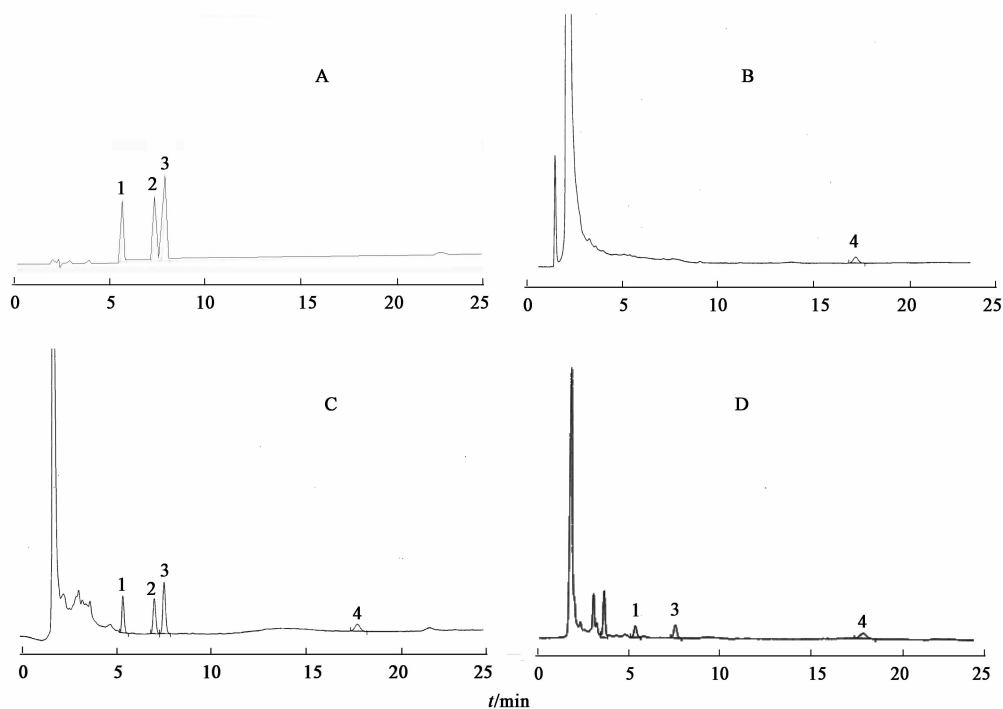
2.1 色谱条件 迪马 Dimosail-C₁₈ (4. 6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4. 6 mm × 12. 5 mm, 5 μm) 预柱, 流动相乙腈-水(55:45), 流速 1. 0 mL·min⁻¹, 检测波长 296 nm, 柱温 30 °C, 进样量 30 μL。

2.2 溶液的配制 分别精密称取 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 200 mg·L⁻¹ 对照品储备液和 160 mg·L⁻¹ 内标储备液, 以流动相稀释得到相应浓度对照品和内标溶液, 于 4 °C 冰箱保存。

2.3 血浆样品的处理 取血浆 0. 3 mL 置 5 mL 具塞塑料离心管中, 加入醋酸甲地孕酮内标溶液(1. 6 mg·L⁻¹) 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 沉淀蛋白, 加入乙酸乙酯 2. 0 mL, 涡旋萃取 10 min, 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 °C 水浴氮气流挥干, 残渣加入 100 μL 流动相涡旋振荡 10 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 兔空白血浆、兔空白血浆外加对照品混合溶液 BL, CBG, RBG(4. 0 mg·L⁻¹)、内标醋酸甲地孕酮(1. 6 mg·L⁻¹) 及给药血浆样品, 按 2. 3 项下操作后进行分析, 得色谱图(图 1)。结果表明空白兔血浆对血浆中 BL(5. 6 min), CBG(7. 3 min), RBG(7. 8 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 > 6 000, 分离度均 > 1. 5。

线性关系与检测限 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 BL 及 RBG 质量浓度为 0. 018 8, 0. 037 6, 0. 075 2, 0. 150 4, 0. 376 0, 0. 94 1, 1. 88 2, 3. 76 4 mg·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, 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, RBG 的标准曲线回归方程为 $Y_{BL} = 1. 221X + 0. 107 8 (r = 0. 999 0)$; $Y_{RBG} = 2. 048X - 0. 016 2 (r = 0. 999 8)$, 血浆中 BL, RBG 质量浓度均在 0. 018 8 ~ 3. 76 mg·L⁻¹ 线性关系良好。



A. 蟾酥提取物; B. 空白血浆; C. 空白血浆 + BL, CBG, RBG; D. 兔给药后 15 min 血浆; 1. 蟾毒灵; 2. 华蟾酥毒基; 3. 酯蟾毒配基; 4. 内标
图 1 蟾酥提取物、兔血浆中 BL、CBG、RBG 以及内标的 HPLC

在信噪比 $S/N = 10$ 的条件下, 血浆中 BL, RBG 最低定量质量浓度分别为 $12.5, 10.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.5 回收率 方法回收率: 在 0.3 mL 空白血浆中分别精密加入不同质量浓度混和对照品溶液, 配制成低、中、高 ($0.045, 0.376, 1.875 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 3 种质量浓度的质控样品, 取低、中、高 3 种质量浓度对照品血浆各 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, RBG 质量浓度, 与加样质量浓度比较, 计算方法回收率。结果 BL 低、中、高 3 个质量浓度的方法回收率分别为 $(90.4 \pm 9.8)\%$, $(96.5 \pm 6.9)\%$, $(93.1 \pm 8.0)\%$; RBG 低、中、高 3 个质量浓度的方法回收率分别为 $(90.0 \pm 5.5)\%$, $(91.0 \pm 3.4)\%$, $(94.5 \pm 4.5)\%$ 。

萃取回收率: 在 0.3 mL 空白血浆中分别精密加入不同质量浓度混和对照品溶液, 配制成低、中、高 ($0.045, 0.376, 1.875 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 3 种质量浓度的质控样品各 5 份, 按 2.3 项下操作后进样分析, 以血浆中 BL, RBG 的峰面积与相应质量浓度混合对照品溶液中 BL, RBG 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 BL 低、中、高 3 个质量浓度的萃取回收率分别为 $(91.9 \pm 4.7)\%$, $(94.7 \pm 3.8)\%$, $(92.2 \pm 6.0)\%$; RBG 高、中、低 3 个质量浓

度的萃取回收率分别为 $(93.6 \pm 3.9)\%$, $(96.0 \pm 4.4)\%$, $(97.5 \pm 2.6)\%$ 。

2.6 精密度 在 0.3 mL 空白血浆中分别精密加入不同质量浓度混和对照品溶液, 配制成低、中、高 ($0.045, 0.376, 1.875 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 3 种质量浓度的血浆样品 ($n = 5$), 按 2.3 项下操作后进样分析, 于日内和 5 d 内各测定 3 种质量浓度样品, 计算日内和日间精密度。结果 BL 低、中、高质量浓度日内精密度 RSD 分别为 10.7% , 7.4% , 8.6% , RBG 日内精密度 RSD 分别为 6.2% , 3.8% , 4.8% ; BL 低、中、高质量浓度日间精密度 RSD 分别为 13.5% , 4.5% , 8.2% , RBG 日间精密度 RSD 分别为 5.8% , 13.2% , 5.4% 。

2.7 稳定性试验 在 0.3 mL 空白血浆中分别精密加入不同质量浓度混和对照品溶液, 配制成低、中、高 ($0.045, 0.376, 1.875 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 3 种质量浓度的质控样品各 4 份, 分别于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下存放 12, 24 h, 1 周, 和 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 存放 1 个月 后测定。结果表明血浆中的 BL, RBG 在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下存放 1 周和 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 存放 1 个月 后保持稳定, RSD 11.7% , 9.6% , 均符合 $< 15.0\%$ 的规定。

2.8 方法应用 取新西兰兔 6 只, 雌雄各半, 以 $0.35 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量, 由耳缘静脉注射蟾酥提取物溶液 (20%

乙醇生理盐水溶液配制, $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 分别于给药后 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 min 于心脏取血约 2.0 mL, 肝素抗凝, 经 $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。测定兔血浆中 BL, RBG 质量浓度, 得血药浓度-时间数据, 经 Kinetica 4. 4. 1 软件非房室模型拟合, 得到兔在给药后的平均血药浓度-时间曲线, 见图 2, 主要药代动力学参数见表 1。

3 讨论

3.1 3种成分的代谢比较 华蟾酥毒基在给药后

表 1 BL, RBG 在兔体内的药代动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

成分	$C_{\max} / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	T_{\max} / min	$T_{1/2} / \text{min}$	$AUC_{0-90} / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$AUMC_{0-90} / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	MRT_{0-90} / min
iBL	0.5374 ± 0.118	2	21.83 ± 3.29	6.709 ± 0.600	132.02 ± 21.33	19.62 ± 2.12
iRBG	0.5395 ± 0.107	2	31.55 ± 6.90	17.068 ± 2.824	315.47 ± 64.33	18.227 ± 4.041

2 min 血样中检测的量已经很少, 5 min 时几乎不能被检测, 而蟾毒灵及酯蟾毒配基在兔体内 60 ~ 90 min 时均能测到, 故本文仅建立了兔血浆中蟾毒灵以及酯蟾毒配基的 HPLC 测定方法。上述结果表明: 华蟾酥毒基较另外 2 种成分在兔体内代谢速度极快, 通过文献及相关研究发现, 华蟾酥毒基在大鼠以及犬体内的代谢速度明显慢于其在兔体内的代谢, 推测可能由于草食性动物血浆中所含的特异酶有关。经单一成分静脉给药以及 HPLC-MS 结构确证, 表明华蟾酥毒基在动物体内迅速代谢为去乙酰基华蟾, 为其主要代谢产物, 体内代谢参数有待做进一步的研究。

3.2 生物样品的处理方法 曾尝试过仅采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, 并尝试了乙醚、正己烷、乙酸乙酯以及不同配比的乙醚与乙酸乙酯混合溶剂等, 最终确定采用乙腈沉淀蛋白结合有机溶剂乙酸乙酯萃取的方法, 得到了较为满意的结果。

3.3 蟾酥的药理活性 蟾酥具有镇痛、抗炎、抗肿瘤等多种药理活性, 而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的研究提供参考。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010:376.

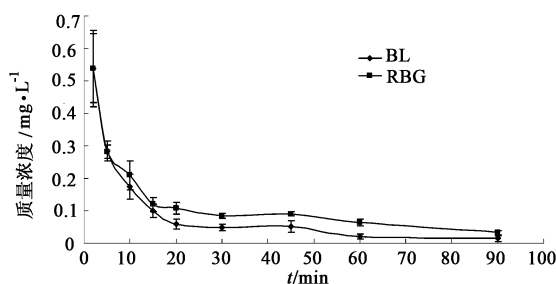


图 2 BL, RBG 兔血浆中的浓度-时间曲线 ($n = 6$)

[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 Qiong-lin, 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 Xing, 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] Analytica Chimica Acta, 2008, 610(15): 224.

[6] Liang Y, Liu Ai 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(2): 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] 夏祖猛, 王利胜, 赖宝林, 等. 芎冰微乳在新西兰兔体内的药动学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 119.

[9] 姚宗玲, 陆洋, 杜守颖, 等. 醒脑静滴鼻液中栀子苷的家兔体内药动学研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(14): 1871.

[责任编辑 邹晓翠]