

雄黄微生物溶解液药物动力学研究

张景红^{1,2*}, 樊 秦³, 李红玉¹

(1. 兰州大学生命学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 华侨大学教育部分子药物研究中心, 福建 泉州 362021;
3. 甘肃省中医学院动物实验中心, 甘肃 兰州 730030)

摘要: 以砷酸 (ATO) 为对照, 研究雄黄微生物溶解液 (RBS) 的药物动力学行为, 探索雄黄溶解后, 其中砷在大鼠体内吸收和分布的变化规律。以砷酸 (腹腔注射, 含砷量 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 为对照组, 雄黄微生物溶解液 (腹腔注射, 含砷量 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 为给药组, 测定药物中砷在大鼠血液中的浓度及在心、肝、脾、肺、肾和脑等组织中的浓度, 并研究药代动力学参数的变化。RBS 组药代动力学参数与 ATO 组接近, 其中砷在大鼠各组织中蓄积量大幅度降低, 与对照组相比具有显著差异。雄黄经生物溶解后, 以无机砷或有机砷的形式存在, 与对照组相比, 砷的形态成分发生明显变化, 药物生物利用度明显提高, 砷在组织中几乎没有蓄积。这一结果可能为微生物技术在研究、开发雄黄的应用提供有力依据。

关键词: 雄黄微生物溶解液; 砷形态; 药代动力学

中图分类号: R969

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 10-1279-06

Pharmacokinetics of bacteria bioleaching solution of realgar in rat

ZHANG Jing-hong^{1,2*}, FAN qin³, LI Hong-yu¹

(1. College of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Molecular Medicine Engineering Research Center Ministry of Education, HuaQiao University, Quanzhou 362021, China;
3. Laboratory Animal Research Center, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

Abstract: The paper is to report the preparation of realgar bioleaching solution (RBS) by bacteria and the comparison of pharmacokinetics of RBS and H_3AsO_3 (ATO), and the study of its possible change of absorption and distribution of soluble arsenic in rat. The experiment was carried out on Wistar rats given peritoneal injection of RBS at a dose of $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (soluble arsenic content, $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and rats given ATO at the dose of $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (soluble arsenic content, $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The arsenic concentrations in many tissues including heart, liver, spleen, lung, renal and brain were determined. The changes of pharmacokinetic parameters and arsenic distribution in different tissues were detected and compared in these two groups of rats. The pharmacokinetic parameters of RBS and ATO are very similar. There is very few distribution of arsenic in the tissues in RBS group, compared with the ATO group. There is significant difference in the content of arsenic between two groups statistically ($P < 0.01$). It is feasible that we select the bacteria bioleaching solution as a candidate drug, which may be employed for primary change of arsenic compounds including dissolved inorganic arsenic and organic arsenic, in order to improve bioavailability and decrease the amount of arsenic accumulation in animal tissues. In addition, there is significant difference in the change of arsenic compounds between two groups. It can be concluded that, the investigation on application of microbial technology may provide a basis

收稿日期: 2010-03-08.

基金项目: 甘肃省科技攻关项目 (2GS064-A43-019-02); 教育部科学基金 107108 资助; 福建省自然科学基金 (2008J0102); 泉州市基金项目 (2008Z21) 资助; 华侨大学人才引进启动项目 (BS105).

*通讯作者 Tel: 13506922986, Fax: 86-595-22691829, E-mail: zjh@hqu.edu.cn

for exploratory research of realgar.

Key words: realgar bioleaching solution; arsenic specie; pharmacokinetics

雄黄的主要成分为 As_2S_2 和/或 As_2S_3 , 是一种药用硫化矿物, 水溶性极低。长期以来, 一直以粗大的矿物原粉入药, 不仅因剂量过大给患者带来不便, 而且长期服用往往引发砷在组织中大量蓄积, 进而引发毒性^[1]。传统的处理工艺如水飞、酸洗、酸奶洗等虽使用多年, 但未能解决雄黄的溶解度问题, 雄黄仍以粗糙的原粉入药, 这样单一的给药方式, 严重影响了其在体内的吸收和分布^[2]。目前, 虽已尝试利用纳米技术、微粉化和微射流等方法将传统的雄黄加工至纳米级, 这些方法, 虽在一定程度提高了雄黄的生物利用度, 但由于是混悬液入药, 仍然存在有效成分不明确、溶解不完全、体内作用不清等造成研究困难^[3], 这些现状严重制约了雄黄进一步开发和临床应用。为此, 本课题组成功地利用微生物浸出技术, 生物炮制并溶解雄黄^[4], 提高了雄黄中有效砷的溶出含量。通过比较发现, 雄黄在微生物作用下, 其中砷在水溶液中的溶解量提高了 300 倍 ($0.52 \rightarrow 158.16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)^[5], 初步的药效学实验已证实, 雄黄微生物溶解液具有良好的抑制多种肿瘤细胞增殖的效果, 毛细管电泳分析结果表明, 砷酸和甲基砷酸是其主要的活性成分^[6, 7], 因此有必要对雄黄微生物溶解液进行系统药物动力学研究。本文以砷酸为对照, 比较雄黄微生物溶解液中砷在大鼠体内吸收和组织中分布浓度, 探讨雄黄制成溶液后药物动力学变化规律, 探索砷蓄积量和砷形态的关系, 为深入研究雄黄的减毒、增效机制, 提供有力的实验依据。

材料与方法

仪器与试剂 高压微波消解系统 (Milestone-1200MG, 意大利麦尔斯通公司); 全谱直读等离子体发射光谱 (ICP-AES, IRIS Advantage ER/S, 美国 TJA 公司); PACE/MDQ 高效毛细管电泳仪 (DAD, 二级管检测器, 美国 Beckman 公司)。雄黄由甘肃省中医学院附属医院药剂科提供 (杨锡仓主任中药师鉴定), 按《中国药典》2005 年版方法测定, As_2S_2 含量为 98.56%, 符合药典规定。 As_2O_3 (美国 Sigma 公司, 批号: 070507), 氧化亚铁硫杆菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*), 由兰州大学生物技术开发实验室筛选得到, 菌种保藏号: CCTCC-M204057。砷酸钾 (KH_2AsO_4 , iAs^{V} , 美国 Sigma 公司, 批号: BS0621); 二甲基砷酸 ($((\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH}))$,

DMA^{V} , West Chester 公司, 批号: BS0182); 一甲基砷酸 ($(\text{CH}_3\text{AsNaO}_3\cdot(3/2)\text{H}_2\text{O})$, MMA^{V} , West Chester 公司, 批号: 113701); 吡啶-2, 6-二甲酸 (pyridine 2, 6-dicarboxylic acid, PDC, 美国 Fluka 公司, 纯度 $\geq 98\%$, 批号: 110701); 溴化十六烷基铵盐 (CTAOH, 25% 的甲醇溶液, 日本 Tokyo 公司, 批号: 11498); 砷单元素标准溶液 (ICP 标样, MSAS, $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 美国 IV 标准物质公司, 批号: 13679)。

实验动物 实验用 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 体重 (350 ± 20) g, 清洁级, 甘肃省中医学院动物实验中心提供 (质量合格证 No. 0011806), 动物置于清洁级实验室中饲养, 室温 $20^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$, 相对湿度 $55\% \sim 70\%$ 。

仪器与色谱条件 ICP-AES, 中阶梯光栅一棱镜交叉色散系统, 波长范围 $175 \sim 800 \text{ nm}$, CID 二维电荷注入式固体检测器, 仪器最佳工作条件: As 的分析谱线 189.04 nm , 功率 1350 W , 频率 27.12 MHz , 雾化压力 151.68 kPa , 提升量 $1.85 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 辅助气流量 $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 积分时间 (短波 20 s , 长波 10 s), 将一系列含有 $2.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸的 As 标准溶液和 $1.5\% \text{ NaBH}_4 \sim 0.5\% \text{ NaOH}$ 溶液分别由蠕动泵的两个通道同时泵入“Y”形反应管中, 反应生成的砷烷由氦气载入 ICP 火焰。以砷信号强度-砷浓度作标准曲线, 计算所测的砷的浓度。Milestone-1200MG 温度为 60°C , 时间共设两档, 分别为 20 和 30 min 。微波功率 750 W , 压力为 2.0 MPa 。

药品配制

雄黄微生物提取液 (RBS)^[4] 在 100 mL 改良 9K 培养基 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.0 g ; KCl , 0.1 g ; K_2HPO_4 , 0.50 g ; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.50 g ; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.01 g ; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g ; 蒸馏水, 1 L ; pH 1.8) 中加入雄黄 1 g , 同时按 10% 接种量接种氧化亚铁硫杆菌 (3×10^5), 接种于 100 mL 摇瓶, 调至 pH 1.8, 在 30°C 、转速为 $3.07 \times g$ 的生物摇床上进行摇瓶浸出实验, 浸出期间定期调节溶液 pH, 并补充一定的水分, 28 天后停止, 减压抽滤收集上清液, 溶液调至 pH 7 左右, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜除菌得雄黄微生物溶解液备用。临用前用生理盐水稀释至提取液中砷的质量浓度为 $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 备用。

砷酸溶液 (ATO) 取 As_2O_3 适量, 用 $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaOH}$ 溶解至浓度为 $0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 并用 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

HCl 调至 pH 7.0, 配制砷酸储备液。实验前用生理盐水稀释, 稀释至提取液中砷的质量浓度为 $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 备用。

给药方案 大鼠的用药剂量按照人临床用药(砷酸) 剂量为每人 $10 \text{ mg}^{[8]}$ 进行换算, 大鼠等效剂量 (350 g) = $(X/70 \times 6.3) \times 1.75 \times 0.2$, 其中: 按照体表面积计算大鼠 (体重 200 g) 和人 (体重 70 kg) 的等效剂量折算系数为 6.3, 大鼠体重之间折算系数 ($350/200$) 为 1.75, 砷酸的稀释倍数为 0.2 ($10/50$), $X (\text{mg})$ 为人临床使用的雄黄剂量。计算结果, 大鼠使用砷酸剂量应为 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (砷含量), RBS 给药组同样采用 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (砷含量) 剂量, 腹腔注射给药。

血药样品 体重 350 g 的清洁级大鼠 72 只, 随机分为两组: RBS (实验组) 和 ATO (对照组)。每一组各 36 只。每一组又随机分为 6 小组, 每小组各 6 只, 禁食 12 h。分别按雄黄微生物溶解液 (ip, 含砷量 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和砷酸 (ip, 含砷量 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 给药, 于给药前及给药后 0.25、0.50、1、2、4、6、8、12、16、24、36 和 48 h, 从大鼠心脏采血 0.5 mL , 置于肝素抗凝试管内充分摇匀, 密闭, -20°C 保存至测定。其中第 1、2 只大鼠给药前和给药后 1、6、16 h 采血; 第 3、4 只大鼠给药后 0.25、2、8、24 h 采血; 以此类推。每组 6 只大鼠完成一条药时曲线的采血。每个实验组每个采血点具有 6 个数据。

组织采样 体重 350 g 的清洁级大鼠 72 只, 雌雄各半, 随机分为两组: RBS (实验组) 和 ATO (对照组)。每一组各 36 只。每一组又随机均分为 6 个小组, 每小组各 6 只, 禁食 12 h, 分别按雄黄微生物溶解液和砷酸实验组给药, 于给药前和给药后 6 h, 断头处死, 解剖取脏器组织, 包括心脏、肝、脾、肺、肾和脑。用生理盐水冲洗各脏器组织, 滤纸吸干水分, -70°C 保存, 测定前取出组织样本, 解冻, 称质量, 剪碎, 微波消解后测定。

样品处理方法 血药样品 0.5 mL , 加现配消化液 ($\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2 = 5:2$) 2 mL , 消解至澄清, 随后转移到 25 mL 量瓶中, 加入超纯水定容 25 mL , 作为血液样品储备液。组织脏器样品 0.5 g , 放入聚四氟乙烯的溶样罐, 加现配消化液 ($\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2 = 4:1$) 5 mL , 放入消解器进行消解。温度为 60°C , 时间分别为 20 和 30 min, 消解完毕后, 自然冷却至常温后取出, 定容至 50 mL 作为样品检测液。

方法学考察

砷储备液的配制 吸取 $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 砷单元素标准溶液适量, 置于 100 mL 量瓶中, 用去离子水稀释

至刻度, 得到系列砷标准储备液, 冰箱中保存备用。

标准曲线 ① 全血标准曲线: 分别取正常大鼠空白抗凝全血 0.5 mL , 再分别加入砷标准储备液, 使全血中药物浓度分别为 0.04、0.2、0.4、0.8 和 $1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 同“血样样品”项下处理。② 组织标准曲线: 取正常大鼠组织 (心脏、肝、脾、肺、肾和脑组织) 各一份, 每份 0.5 g , 混匀后加生理盐水在冰浴中制成匀浆。分别称取组织匀浆液 0.5 mL , 加入 50 mL 三角瓶中, 再分别加入砷标准溶液, 使其中砷含量分别为 0、0.2、0.4、0.8 和 $1.6 \mu\text{g}$, 同“血样样品”项下处理。在选定的最佳工作条件下, 以砷信号强度 (Y)-砷浓度 (X) 作标准曲线, 进行线性回归, 分别得到标准曲线如下: 全血 $Y_b = 0.2701 X_b + 0.0040$, ($r = 0.9998$); 组织 $Y_g = 0.0269 X_g + 0.0006$ ($r = 0.9999$); 线性范围: $0.04 \sim 1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。以信号/噪音=3 计算, 全血中检测限为 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

精密度实验 分别取 0.04、0.4 和 $1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 等 3 种浓度砷全血样品, 测定药物浓度, 测定后置室温保存, 每种浓度平行作 5 份, 计算日内差异; 于第 1、2、3、4 和 5 天重复测定, 计算日间差异。结果表明, 在上述 3 种浓度下, 日内 RSD 分别为 3.6%、2.4% 和 1.6%; 日间 RSD 分别为 4.1%、3.4% 和 1.8%; 按前述方法处理样品并测定其中药物浓度, 结果表明, 在上述 3 种浓度下, 组织日内 RSD 分别为 2.6%、3.1% 和 2.8%; 组织日间 RSD 分别为 3.3%、5.7% 和 4.6%。

准确度实验 分别取 0.04、0.4 和 $1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 等 3 种浓度砷全血样品, 每种浓度平行作 5 份, 其结果按标准曲线法计算浓度, 所得浓度与实际浓度的比值即为回收率。结果表明, 在上述 3 种浓度下, 全血样品的相对回收率分别为 $(91.2 \pm 2.9)\%$ 、 $(90.6 \pm 3.8)\%$ 和 $(93.6 \pm 3.2)\%$ 。组织相对回收率分别为 $(98.1 \pm 5.3)\%$ 、 $(100.3 \pm 3.8)\%$ 和 $(97.2 \pm 2.9)\%$ 。

药物稳定性 大鼠 4 只, 雌雄各半, 分别按雄黄微生物溶解液 (ip, 含砷量 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和砷酸 (ip, 含砷量 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 给药, 6 h 后心脏采血或取组织, 分别于第 3、5 和 8 天时测定。结果表明, 血液或组织样品保存后与立即测得的浓度差别 RSD 值 $\leq 5\%$, 表明血液或组织样品稳定性良好。

样品测定中的质量控制样品 实验中样品进行每次药物浓度测定时, 同时制备低、中、高浓度的质量控制样品, 随行分析。若质控样品的相对误差超过 20%, 则重新制备标准曲线。结果表明, 质控样品变异均 $\leq 10\%$ 。

样品中砷的形态分析 分别取 RBS 和 ATO 药物

溶液, 用 $0.45\ \mu\text{m}$ 的微孔滤器过滤后, 取滤液 $200\ \mu\text{L}$, 采用高效毛细管电泳仪, 测定各种样品的电泳色谱, 确证其中砷的各种形态。

毛细管电泳条件 采用优化条件 BGE: $\text{PDC}/10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $\text{CTAOH}/1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。分离条件: 电压 $25\ \text{kV}$, 温度 $25\ ^\circ\text{C}$, $\text{pH}\ 11.0$, 紫外检测波长 $216\ \text{nm}$ 。iAs^V、MMA^V、DMA^V 和 (iAsIII) 的储液浓度均为 $(1\ 000\pm 5)\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

数据统计分析 应用 Kinetica 5.0 药代动力学软件, 对药时曲线进行房室或非房室模型拟合, 求出药代动力学参数。采用 SPSS 17.0 软件, 进行生物等效性分析, SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析。

结果

1 大鼠给药后药代动力学结果分析

两组药物 (RBS 和 ATO 组) 分别给药, 各组大鼠给药后不同时间点取血, 测定血浆药物浓度, 绘制各时间点药-时曲线 (图 1A)。采用 Kinetica 5.0 药代动力学软件对药-时数据进行拟合处理 (图 1B), 计算各组药代动力学参数见表 1, 结果显示, 两组 (RBS 和 ATO) 药时曲线分别符合一室和二室房室模型, 权重系数分别为: $C/1$ (RBS) 和 $C/1\cdot C/1$ (ATO)。由于两组药物药代动力学参数, 按照房室模型计算, 具有显著差异, 为此, 本文进行非房室拟合, 分别计算 RBS 和 ATO 组各种主要药代动力学参数, 采用 SPSS 软件进行数据统计分析, 比较各组药代动力学参数的差异。结果表明, 雄黄经微生物溶解后, 其药代动力学参数发生了改变, 在含砷量相同的条件下, 雄黄微生物溶解液和与 ATO 组动力学参数变化比较相似, 但其 C_{max} 、 $\text{AUC}_{0\rightarrow t}$ 、 $\text{AUC}_{0\rightarrow\infty}$ 、 $\text{AUMC}_{0\rightarrow t}$ 和 $\text{AUMC}_{0\rightarrow\infty}$ 值的变化, 明显高于 ATO 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 两组药物 $\text{MRT}_{0\rightarrow t}$ 和 $\text{MRT}_{0\rightarrow\infty}$ 没有明显变化, 其 $C_{\text{max}}/\text{AUC}$ 没有显著的差异。

2 大鼠给药后砷在组织中分布结果分析

两给药组的砷在大鼠心、肝、脾、肺、肾、脑中的分布情况见表 2。从表中可以看到, 两组药物给药 6 h 后, 砷在各组织中分布情况有明显的变化。砷酸给药后, 砷在各种组织中仍有蓄积, 而采用微生物溶解的雄黄溶解液, 其中砷在各个组织分布极少, 几乎没

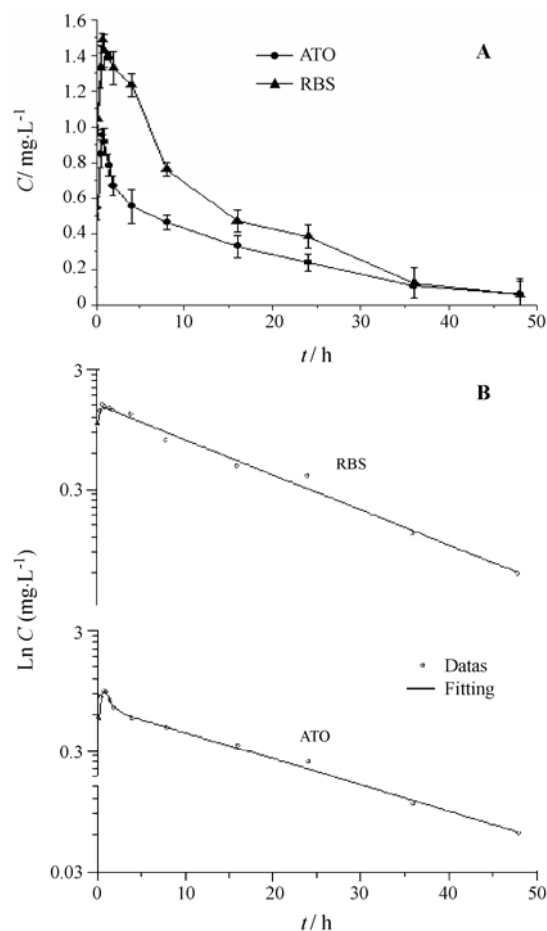


Figure 1 Mean blood concentrations of arsenic in Wistar rat after single peritoneal injection of different tested drug groups. A: Curve of C - t , B: Curve of $\ln C$ - t . RBS: Bioleaching solution of ground realgar by bacteria (peritoneal injection, content of total arsenic, $0.3\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), ATO: Arsenic acid solution (peritoneal injection, content of total arsenic, $0.3\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

Table 1 The pharmacokinetic parameters of different tested drug groups (RBS and ATO) by ip in rat. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ RBS vs ATO

Parameter	RBS	ATO
$C_{\text{max}}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$1.49 \pm 0.08^*$	0.95 ± 0.06
t_{max}/h	0.75 ± 0.12	0.75 ± 0.08
$\text{AUC}_{0\rightarrow t}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$	$21.92 \pm 1.11^*$	13.09 ± 1.68
$\text{AUC}_{0\rightarrow\infty}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$	$22.79 \pm 2.18^*$	14.30 ± 2.36
$C_{\text{max}}/\text{AUC}/\text{h}^{-1}$	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.02
$\text{AUMC}_{0\rightarrow t}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^2$	$301.71 \pm 6.32^{**}$	197.42 ± 4.29
$\text{AUMC}_{0\rightarrow\infty}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^2$	$356.74 \pm 9.23^{**}$	269.76 ± 3.49
$\text{MRT}_{0\rightarrow t}/\text{h}$	13.76 ± 2.46	15.09 ± 2.86
$\text{MRT}_{0\rightarrow\infty}/\text{h}$	15.65 ± 1.21	19.56 ± 1.31

Table 2 The arsenic distribution ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) in viscera of rat after RBS or ATO treated with 6 h. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs ATO

Drug	Heart	Liver	Spleen	Lung	Renal	Brain
RBS	$0.02 \pm 0.01^{**}$	$0.04 \pm 0.02^{**}$	$0.05 \pm 0.02^{**}$	$0.03 \pm 0.01^{**}$	$0.08 \pm 0.03^{**}$	0^{**}
ATO	16.12 ± 1.35	89.38 ± 7.32	98.61 ± 6.21	10.16 ± 2.08	98.48 ± 6.18	16.46 ± 2.39

有蓄积, 与对照给药组相比, 具有显著差异 ($P < 0.01$)。

3 生物等效性评价

以 ATO 组为参比, 对雄黄微生物溶解液的药代动力学参数 $AUC_{0 \rightarrow t}$ 、 $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ 、 C_{max} 经对数转换后进行方差分析, 结果显示, 与 ATO 组相比, 两组 $\ln AUC_{0 \rightarrow t}$ 、 $\ln AUC_{0 \rightarrow \infty}$ 和 C_{max} 的差异具有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。经双单侧 t 检验及 90% 置信区间分析结果 (表 3) 表明, 雄黄微生物溶解液与 ATO 相比具有生物等效性。

Table 3 Bioequivalence between RBS and ATO. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs group

Test	RBS-ATO		
	$\ln AUC_{0 \rightarrow t}$	$\ln AUC_{0 \rightarrow \infty}$	$\ln C_{max}$
Tx ₁ ($t_{1-0.05} = 2.92$)	34.37	28.51	14.73
Tx ₂ ($t_{1-0.05} = 2.92$)	35.35	29.09	15.65
90% Upper limit of confidence interval	98.00	97.80	95.60
90% Lower limit of confidence interval	101.40	101.80	103.20

4 样品中砷的形态分析

取待测各药品溶液, 按优化好的电泳条件进行分离, 电泳色谱分离效果见 (图 2), 通过比较可以看出, 两种药品所含砷的种类部分相同 (iAs^V)。与对照药物砷酸相比, 雄黄微生物溶解液所含砷形态成分明显增加, 同时含有两种形态的砷化合物 (iAs^V 和 MMA^V)。

讨论

雄黄微生物溶解液砷在体内代谢过程符合一室模型 (权重 $C/1$)、而对照组 (ATO $C/1 * C/1$) 符合二

室开放模型, 表明雄黄制成生物溶解液后可能会引起其在动物体内的药代动力学模型的改变。在含砷量相同的条件下, 同属砷剂的雄黄制成溶解液后, 体内可溶解砷的吸收情况与砷酸 (溶解砷的主要方式) 变化趋势比较类似, 与砷酸比较, 其生物利用度显著提高。而二者 C_{max}/AUC 无显著差异^[9], 生物等效性分析结果表明二者等效。由此推测, 雄黄中砷生物溶出后的药物吸收规律, 符合含可溶砷化合物的代谢规律。但是, 在药物的分布方面有一定差异, 与砷酸相比, 在其生物利用度提高的同时, 砷在组织中分布的含量大幅度降低, 在心、肝、脾、肺、肾、脑等组织的分布极低, 几乎没有蓄积。对砷酸来说, 其中可溶砷属于二室模型, 砷在上述组织则都有分布, 其中肝和肾含量为最多。这一实验结果与 Lindgren 等^[10]的研究报告一致。报告指出, 小鼠以静脉注射途径给予不同价态 (III, V) 的砷后, 开始时在肝、胆、肾中浓度最高, 并且很快从这些器官中消除。静脉注射 ^{76}As -氧化砷 (III) ($0.1 \sim 0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 10 min 和 1、6、48 h 后, 在小鼠的肝、肾组织内, 每克组织所含 ^{76}As 的含量最高^[11]。而在本实验中, 在含有相同砷剂量条件下, 雄黄微生物溶解液中砷在大鼠脏器组织分布与砷酸不同, 推测可能与二者药品中砷的赋存形态差异有关。比较巧合的是, 雄黄溶解液含有 As^V 和 MMA^V 两种价态, 而砷酸溶液在溶液中只有 As^V 一种价态。按照生物体内砷的代谢机制, As^V 中有 50%~70% 的量很快还原为 As^{III} , 并由血液进入肝脏甲基化, 再经肾脏排泄^[12]。Buchet 等^[13]指出, MMA^V 按照静脉方式给药, 仅以 MMA^V 原形经尿液排出体外。与砷酸不同的是, 雄黄溶解液含有 40% MMA^V ^[14], 这

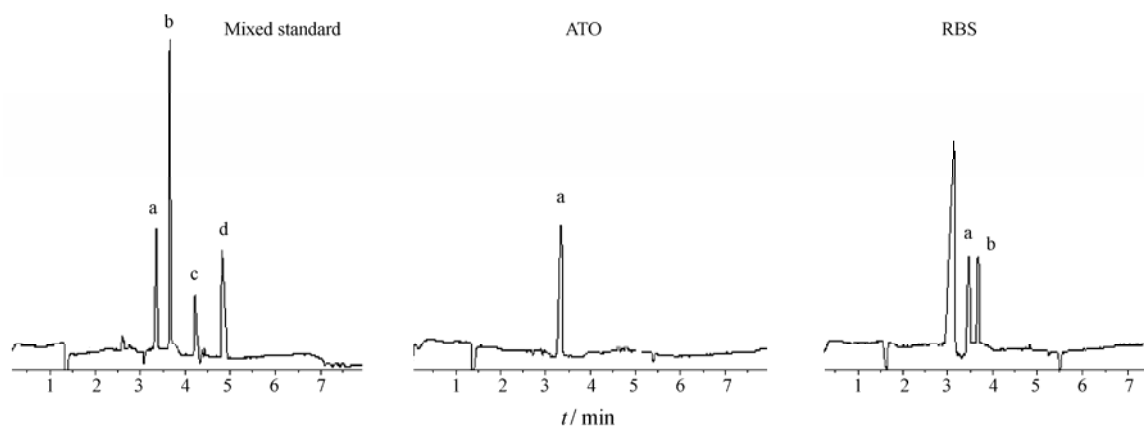


Figure 2 Capillary electropherograms of ATO and RBS. Peaks a: iAs^V (3.354 min); b: MMA^V (3.650 min); c: iAs^{III} (4.217 min); d: DMA^V (4.825 min). Analytical conditions: $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PDC/ $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CTAOH BGE at pH 11.0; applied voltage: 25 kV; temperature: 25°C ; UV detector wavelength: 216 nm. Concentration of each analyte of standard mixture is $9 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

一形态成分的存在有可能对雄黄中可溶性砷的分布过程产生影响, 这可能是雄黄溶解液在肾、肝和肺等组织中分布比砷酸少的主要原因。雄黄溶解后, 其中成分不仅含有可溶性砷, 而且还包括砷在体内代谢减毒后的产物 (MMA^{V}), 由此说明, 砷形态成分的变化可能与其组织蓄积量密切相关。控制溶解砷的形态成分, 则有可能降低砷在组织中的蓄积量, 进而降低由此引发的毒性反应。为此, 采用微生物技术溶解雄黄, 产生微量、组织蓄积量较小的各种形态的溶解砷^[15], 代替组织蓄积毒性强的粗糙雄黄, 可能为雄黄的减毒研究提供一种新的思路和方法。

近年来, 中药雄黄对白血病、实体瘤和逆转多种耐药肿瘤有良好疗效, 但由于其体外水溶解性极差, 生物利用度较低, 其中砷在大鼠组织蓄积含量较高^[14], 目前临床上和研究中仅有粗糙的原粉、微粉化和纳米雄黄混悬液等形式, 对该药的药代动力学研究多集中在不溶性砷 (包括部分可溶性砷) 的体内代谢比较, 而对其中溶解砷体内动力学的研究则很少涉及。本实验进行雄黄中可溶性砷的药物动力学研究, 结果表明, 雄黄溶解后, 生物利用度提高了 3.45 倍, 其中砷在大鼠组织中蓄积大幅度降低, 几乎无分布。本文首次从药物动力学角度探讨以微量、组织蓄积量低、生物利用度高的多种形态砷溶液代替传统的粗糙雄黄的合理性。这一实验结果可能为采用微生物技术深入研究雄黄的减毒、增效提供有力依据。

References

- [1] Zhang W, Yu BY, Kou JP. Studies on the correlation between toxicity and activities of realgar [J]. Chin J Nat Med (中国天然药物), 2004, 2: 123–125.
- [2] Wu XH, Sun DH, Zhuang ZX, et al. Analysis and leaching characteristics of mercury and arsenic in Chinese medicinal material [J]. Anal Chim Acta, 2002, 453: 311–323.
- [3] Ning N, Peng ZF, Yuan L, et al. Realgar nano-particles induce apoptosis and necrosis in leukemia cell lines K562 and HL-60 [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2005, 30: 136–140.
- [4] Zhang JH, Zhang X, Ni YQ, et al. Bioleaching of arsenic from medicinal realgar by pure and mixed culture [J]. Process Biochem, 2007, 42: 1265–1271.
- [5] Zhang JH, Zhang B, Wang XQ, et al. Enhancement of a bioleaching solution for dissolution rate and bioavailability of medical realgar, a poorly water-soluble arsenic compound (As_2S_3), by bacteria [J]. J Biotechnol, 2008, 136: S496–S505.
- [6] Liang GG, Zhang QW. Effects of the solubility of various components in cinnabar and realgar on its efficacy and toxicity [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2002, 27: 391–392.
- [7] Du WJ. Study on the Bioleaching of Realgar, Bacteriostasis Function and Medical Efficacy of Realgar Microorganism Lixivium (雄黄的微生物浸出及其溶解液的抑菌药效作用研究) [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2008: 3–9.
- [8] Xu SY, Bian RL, Chen X. Methodology of Pharmacological Experiment (药理实验方法学) [M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 1860–1861.
- [9] Ling XL, Liao ZG, Wang GF, et al. Influence of combination of extractum Angelicae Dahuricae Siccum and total alkaloids of Rhizoma Corydalis on pharmacokinetics of tetrahydropalmitine in rats [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2009, 44: 645–650.
- [10] Lindgren A, Vahter M, Dencker L. Autoradiographic studies on the distribution of arsenic in mice and hamsters administered ^{74}As -arsenite or -arsenate. [J]. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh), 1982, 51: 253–265.
- [11] Vahter M, Norin H. Metabolism of ^{74}As -labeled trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice [J]. Environ Res, 1980, 21: 446–457.
- [12] Vahter M. Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups [J]. Sci Prog, 1999, 82: 69–88.
- [13] Buchet JP, Launerys R. Study of inorganic arsenic methylation by rat liver *in vitro*: relevance for the interpretation of observation in man [J]. Arch Toxicol, 1985, 57: 125–129.
- [14] Zhang JH. Preparation of Realgar Bioleaching Solution with Bacteria and Its Activities in Anti-tumor (雄黄微生物溶解液制备及其抗肿瘤作用作用) [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2007: 54–59.
- [15] Yuan ZB, Han SB, Zhu M. Study on speciation of arsenic mineral drugs in body [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1999, 34: 475–480.