

## · 药物研究 ·

## 浙贝乙素及其 5 种衍生物对小鼠的半数致死量测定\*

杨曦亮,张勇慧,阮汉利,皮慧芳,吴继洲

(华中科技大学同济医学院药学院,武汉 430030)

**[摘要]** 目的 研究浙贝乙素及其 5 种衍生物的急性毒性和对小鼠的半数致死量( $LD_{50}$ )。方法 取昆明种小鼠,完全随机平均分组后腹腔注射给药,分别给予不同浓度的浙贝乙素乙酰化物、丙酰化物、丁酰化物、苯甲酰化物和氧化物药液。以小鼠急性死亡率为指标,求浙贝乙素各衍生物的  $LD_{50}$  和  $LD_{50}$  的 95% 可信区间。结果 浙贝乙素乙酰化物、丙酰化物、丁酰化物、苯甲酰化物和氧化物对小鼠的  $LD_{50}$  分别为 14.39, 14.47, 18.41, 23.21, 9.98  $mg \cdot kg^{-1}$ , 均大于浙贝乙素对小鼠的  $LD_{50}$ 。结论 浙贝乙素乙酰化物、丙酰化物、丁酰化物、苯甲酰化物和氧化物的毒性均较小,有望从中筛选出高效、低毒的镇咳药物。

**[关键词]** 浙贝乙素;衍生物;半数致死量;生物碱

**[中图分类号]** R965.3

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1004-0781(2005)08-0660-03

 **$LD_{50}$  Determination of Peiminine and Its Five Derivatives in Mice**

YANG Xi-liang, ZHANG Yong-hui, RUAN Han-li, PI Hui-fang, WU Ji-zhou (School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**ABSTRACT Objective** To determine the acute toxicity and  $LD_{50}$  of peiminine and its five derivatives in mice.

**Methods** Mice of the Kunming strain were randomly divided into 33 groups with 10 animals in each group. Mice of different groups were given each an intraperitoneal injection of peiminine and its 5 derivatives in different doses separately. Values of  $LD_{50}$  and 95% confidence interval of the 6 drugs were then calculated with the Bliss method. **Results** The  $LD_{50}$  of acetyl peiminine, propionyl peiminine, butyryl peiminine, benzoyl peiminine and peiminine oxide were shown to be 14.39, 14.47, 18.41, 23.21 and 9.98  $mg \cdot kg^{-1}$ , respectively, all of which being larger than that of peiminine (6.86  $mg \cdot kg^{-1}$ ). Corresponding results were obtained in the calculation of the  $LD_{50}$  95% confidence intervals of the 6 drugs. **Conclusion** All the five derivatives of peiminine were shown to have lower toxicity than that of peiminine and it is hopeful to find antitussives of high potency and low toxicity from these derivatives.

**KEY WORDS** Peiminine; Derivative;  $LD_{50}$ ; Alkaloid

湖北贝母(*Fritillaria Hupehensis* Hsiao et K. C. Hsia)是第 2 大贝母主流品种。该药镇咳祛痰的主要有效成分是生物碱<sup>[1]</sup>,除两种已知的生物碱浙贝甲素(Peimine)和浙贝乙素(Peiminine)外,吴继洲等从湖北贝母中分离鉴定了 8 种新的生物碱:湖贝甲素(Hupehenine)、湖贝乙素(Hupehenirine)、湖贝甲素苷(Hupeheninoside)、湖贝嗉(Hupehenizine)、湖贝新(Hupehenisine)、湖贝啉(Hupehenidine)<sup>[2]</sup>、鄂贝新(Ebeiensine)<sup>[3]</sup>、湖贝苷(Hupehemonoside)<sup>[4]</sup>等。药理实验证明,浙贝乙素有镇咳镇静作用和降血压活性<sup>[5,6]</sup>,是湖北贝母的主要有效成分之一。为了解浙

贝乙素衍生物的活性与毒性的关系,确定药物的治疗指数及安全范围,为进行药效评价提供剂量设计依据,笔者在本实验中对浙贝乙素及其 5 种衍生物浙贝乙酰化物、丙酰化物、丁酰化物、氧化物、苯甲酰化物对小鼠的半数致死量( $LD_{50}$ )进行了测定。

**1 实验材料**

**1.1 实验动物** 昆明种小鼠(华中科技大学同济医学院实验动物学部提供)共 340 只,雌雄各半,体重 18~22 g,实验室温度( $20 \pm 2$ ) $^{\circ}C$ ,湿度( $65 \pm 15$ )%。

**1.2 受试样品** 浙贝乙素 5 种衍生物单体(包括浙贝乙素乙酰化物、丙酰化物、丁酰化物、氧化物、苯甲酰化物等)由华中科技大学同济医学院药学院张勇慧老师提供。

**2 方法与结果**

**2.1 受试品的制备** 用分析天平分别准确称取浙贝乙素及其 5 种衍生物(浙贝乙素 12.30 mg、浙贝乙素乙酰化物 27.20 mg、浙贝乙素丙酰化物 22.40 mg、浙贝乙素丁酰化物 30.00 mg、浙贝乙素氧化物 13.50 mg、浙贝乙素苯甲酰化物 30.00 mg),将其分别与羧甲

**[收稿日期]** 2004-11-17 **[修回日期]** 2004-12-31

**[基金项目]** \* 国家中医药管理局新药基金资助项目(基金编号:D2X004A)

**[作者简介]** 杨曦亮(1980-),女,湖北武汉人,在读硕士,主要从事天然药物化学研究。电话:027-83657870, E-mail:yx117@sina.com。

**[通讯作者]** 吴继洲,男,教授,博士生导师,主要从事天然药物的活性研究。E-mail:ywjz@mails.tjmu.edu.cn。

基纤维素钠(CMC-Na)粉末 20.00 mg 研磨均匀至混悬,纯化水定容至 20 mL,得到 6 种药物的原液。置超声波清洗器中超声处理 20 min,摇匀,采用梯度稀释法依次稀释,得到 6 种药物的各剂量组溶液。另同法配制浓度为 0.1% 的 CMC-Na 阴性对照品溶液。

**2.2  $LD_{50}$  的测定** 取平均体重为(20 ± 2) g 的健康昆明种小鼠 340 只,完全随机分组。每组 10 只,雌雄各半。实验前禁食不禁水 12 h。实验时取适量受试药物行小鼠腹腔注射,注射量为 0.4 mL · (20 g)<sup>-1</sup>。在控制组别为 5 或 6 组的前提下,合理选择剂距(浙贝乙素及其乙酰化物、丙酰化物、苯甲酰化物的剂距为 0.80,丁酰化物、氧化物的剂距为 0.85)。染毒后观察 7 d,记录各组小鼠中毒症状、死亡时间和死亡数。

**2.3 统计学方法** 用 Bliss 法计算  $LD_{50}$  及其 95% 的可信区间。分析软件为 RM6280C 多道生理信号采集处理系统 3.3。

**2.4 急性毒性和  $LD_{50}$  实验结果** 各组小鼠腹腔注射药物后急性毒性实验结果见表 1~6,  $LD_{50}$  统计结果见表 7。

表 1 小鼠腹腔注射浙贝乙素的急性毒性实验结果

组别	给药剂量/ (mg · kg <sup>-1</sup> )	对数剂量	小鼠数/ 只	死亡数/ 只	死亡率/ %
1	12.29	1.089 6	10	10	100.0
2	9.83	0.992 6	10	9	90.0
3	7.86	0.895 4	10	7	70.0
4	6.29	0.798 7	10	3	30.0
5	5.03	0.701 6	10	2	20.0
6	4.02	0.604 2	10	0	0.0

表 2 小鼠腹腔注射浙贝乙素乙酰化衍生物的急性毒性实验结果

组别	给药剂量/ (mg · kg <sup>-1</sup> )	对数剂量	小鼠数/ 只	死亡数/ 只	死亡率/ %
1	27.20	1.434 6	10	10	100.0
2	21.76	1.337 7	10	9	90.0
3	17.41	1.240 8	10	7	70.0
4	13.93	1.144 0	10	6	60.0
5	11.14	1.046 9	10	3	30.0
6	8.91	0.949 9	10	0	0.0

表 3 小鼠腹腔注射浙贝乙素丙酰化衍生物的急性毒性实验结果

组别	给药剂量/ (mg · kg <sup>-1</sup> )	对数剂量	小鼠数/ 只	死亡数/ 只	死亡率/ %
1	22.40	1.350 2	10	10	100.0
2	17.92	1.253 3	10	6	60.0
3	14.34	1.156 5	10	4	40.0
4	11.47	1.059 6	10	2	20.0
5	9.18	0.962 8	10	1	10.0

表 4 小鼠腹腔注射浙贝乙素丁酰化衍生物的急性毒性实验结果

组别	给药剂量/ (mg · kg <sup>-1</sup> )	对数剂量	小鼠数/ 只	死亡数/ 只	死亡率/ %
1	30.00	1.477 1	10	10	100.0
2	25.50	1.406 5	10	8	80.0
3	21.68	1.336 1	10	7	70.0
4	18.42	1.265 3	10	6	60.0
5	15.66	1.194 8	10	3	30.0
6	13.31	1.124 2	10	1	10.0

表 5 小鼠腹腔注射浙贝乙素氧化物的急性毒性实验结果

组别	给药剂量/ (mg · kg <sup>-1</sup> )	对数剂量	小鼠数/ 只	死亡数/ 只	死亡率/ %
1	13.51	1.130 7	10	10	100.0
2	11.48	1.059 9	10	8	80.0
3	9.76	0.989 4	10	4	40.0
4	8.30	0.919 1	10	2	20.0
5	7.05	0.848 2	10	1	10.0

表 6 小鼠腹腔注射浙贝乙素苯甲酰化衍生物的急性毒性实验结果

组别	给药剂量/ (mg · kg <sup>-1</sup> )	对数剂量	小鼠数/ 只	死亡数/ 只	死亡率/ %
1	30.00	1.47 4	10	8	80.0
2	24.00	1.380 2	10	5	50.0
3	19.20	1.283 3	10	3	30.0
4	15.36	1.186 4	10	1	10.0
5	12.29	1.089 6	10	0	0.0

表 7 小鼠腹腔注射浙贝乙素及其 5 种衍生物的  $LD_{50}$  实验结果

样品	$LD_{50}$ / (mg · kg <sup>-1</sup> )	95% 可信区间/ (mg · kg <sup>-1</sup> )
浙贝乙素	6.86	16.13 ~ 7.68
乙酰化物	14.39	12.65 ~ 16.37
丙酰化物	14.47	12.66 ~ 16.54
丁酰化物	18.41	16.60 ~ 20.42
氧化物	9.98	9.22 ~ 10.81
苯甲酰化物	23.20	20.34 ~ 26.48

**2.5 给药后小鼠一般状况** 小鼠中毒症状主要表现为神经系统的毒性反应,首先是活动减少,静伏少动。随后表现为皮毛松散、往返跑动、呼吸加速、活动增多,偶有尿失禁,死亡时常乱蹦乱跳,直至无力,呼吸渐加深加快至死。死亡时常有尸体僵硬、强直、口张开。存活小鼠在给药后 2 h 恢复正常进食,以后均未见行为异常。

给予浙贝乙素、浙贝乙素乙酰化物、丙酰化物、氧化物的各组小鼠的死亡时间集中在 30 min 内,分别在给药后 60,60,80,50 min 内死亡;给予浙贝乙素丁酰化物、苯甲酰化物的小鼠均集中在 30 min 内死亡,分

别在给药后 190,160 min 内死亡。阴性对照组小鼠未见死亡。

给药 7 d 后称量各组存活小鼠的体重:给予低剂量浙贝乙素乙酰化物的 小鼠与阴性对照组比较,平均体重差异有显著性 ( $P < 0.05$ );所有给予不同剂量浙

贝乙素苯甲酰化物的 小鼠体重与阴性对照组比较均差异有极显著性(均  $P < 0.01$ );其他各组与阴性对照组比较,差异无显著性。所有给药组小鼠的平均体重均较阴性对照组小鼠减轻。结果见表 8。

表 8 各给药组存活小鼠的体重

g,  $\bar{x} \pm s$

药物	剂量 1	剂量 2	剂量 3	剂量 4	剂量 5	剂量 6
浙贝乙素组	-	6.54 ± 0.00	6.35 ± 0.51 <sup>*1</sup>	6.84 ± 0.29	9.43 ± 1.04	3.50 ± 1.74
乙酰化物组	-	8.29 ± 0.00	10.67 ± 2.40	6.40 ± 1.51	5.14 ± 1.00 <sup>*1</sup>	4.26 ± 2.99 <sup>*2</sup>
丙酰化物组	-	6.88 ± 2.24	5.88 ± 2.73	6.80 ± 3.05	5.86 ± 2.07	-
丁酰化物组	-	8.04 ± 0.97	7.57 ± 0.91	8.20 ± 1.57	8.15 ± 1.65	8.12 ± 1.32
氧化物组	-	9.40 ± 1.11 <sup>*1</sup>	8.80 ± 1.23	7.48 ± 2.15	7.48 ± 2.19	-
苯甲酰化物组	4.45 ± 11.86 <sup>*2</sup>	3.62 ± 2.06 <sup>*2</sup>	5.07 ± 2.32 <sup>*2</sup>	5.11 ± 1.67 <sup>*2</sup>	5.26 ± 2.00 <sup>*2</sup>	-
CMC-Na 组	7.29 ± 1.75	7.29 ± 1.75	7.29 ± 1.75	7.29 ± 1.75	7.29 ± 1.75	7.29 ± 1.75

注:与给予 CMC-Na 的小鼠比较,<sup>\*1</sup> $P < 0.05$ ,<sup>\*2</sup> $P < 0.01$

### 3 讨论

由本实验结果可知,以浙贝乙素为先导化合物,进行结构改造和结构修饰后得到的 5 种衍生物的毒性显著减轻,尤其是浙贝乙素丁酰化物和苯甲酰化物毒性明显降低。目前已发现乙酰化浙贝乙素具有很强的镇咳、祛痰、平喘活性,且作用远强于浙贝乙素,整体效果明显。本实验结果为开发以浙贝乙素为基础的高效、低毒的镇咳药物奠定了理论基础。同时,也为浙贝乙素其他衍生物的开发应用进行了初步探索。

#### [参考文献]

[1] 熊 玮. 湖北贝母药理作用的初步研究[J]. 中草药, 1986,17(1):115.

[2] 吴继洲,濮全龙. 湖北贝母化学成分的研究 VI:应用<sup>13</sup>C 谱解析湖贝碱的结构[J]. 中草药, 1989, 20(5):2-5.

[3] 吴继洲,寇 冰,张玉娥. 湖北贝母属植物化学成分的研究——鄂贝新的结构解析[J]. 同济医科大学学报, 1991, 20(2):89-92.

[4] 吴继洲,汤 明,王 锐. 湖北贝母属植物化学成分的研究 XII——湖贝昔的分离与结构解析[J]. 药学学报, 1991, 26(10):829-835.

[5] 钱伯初,许衡钧. 浙贝母碱和去氢浙贝母碱的镇咳镇静作用[J]. 药学学报, 1985, 20(4):306-308.

[6] 张勇慧,阮汉利,吴继洲. 贝母的药理作用研究概况[J]. 医药导报,2003,22(11):797-799.

## 豚鼠心内注射给药后

## 外耳淋巴液和血浆地塞米松磷酸钠的浓度测定\*

张顺国<sup>1</sup>,陈敏玲<sup>1</sup>,李 方<sup>1</sup>,杨 军<sup>2</sup>,侯东明<sup>2</sup>,吴 皓<sup>2</sup>

(上海第二医科大学附属新华医院 1. 药剂科;2. 耳鼻咽喉-头颈外科,200092)

[摘要] 目的 建立测定豚鼠外耳淋巴液和血浆中地塞米松磷酸钠含量的方法。方法 采用高效液相色谱法测定淋巴液和血浆地塞米松磷酸钠的浓度。固定相:ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:7.56 mmol · L<sup>-1</sup> 硫酸铵-乙腈(70 : 30);流速:1.0 mL · min<sup>-1</sup>;柱温:20℃;检测波长:239 nm。结果 地塞米松磷酸钠浓度测定的线性范围为 0.05 ~ 4.80 mg · L<sup>-1</sup>,  $r = 0.999 8$ ,最低检测限为 6.25 μg · L<sup>-1</sup>,日内和日间 RSD 分别为 1.7% 和 2.3%。给药后 1 h 鼓阶外淋巴液中地塞米松磷酸钠的浓度为 0.08 mg · L<sup>-1</sup>,血浆中地塞米松磷酸钠浓度为 2.77 mg · L<sup>-1</sup>。结论 该方法灵敏、准确、重现性好,可用于血浆和外耳淋巴液中地塞米松磷酸钠的浓度测定。全身给药治疗内耳疾病不是适宜的给药方式,应该探索其他给药途径。

[关键词] 地塞米松,磷酸钠;淋巴液;血浆;高效液相色谱法;含量测定

[中图分类号] R977.1;R965.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2005)08-0662-03