

- 影响[J]. 医药导报, 2011, 30 (12): 1559-1561.
- [4] SAMBORK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
- [5] CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction [J]. Anal Biochem, 1987, 162 (1): 156-159.
- [6] SAXENA A, MOSHYNSKA O, SANKARAN K, et al. Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248) A, in the 5'-UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance [J]. Cancer Lett, 2002, 187(1-2): 199-205.
- DOI 10.3870/ydyb.2012.04.004

## 右美沙芬对小鼠大脑 5-羟色胺含量的影响

李迎春<sup>1</sup>, 张久亮<sup>2</sup>, 周莉红<sup>1</sup>

(1. 武汉钢铁集团公司第二职工医院药剂科, 武汉 430085; 2. 华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070)

**摘要** 目的 初步探讨右美沙芬通过增加小鼠脑部 5-羟色胺(5-HT)的含量的镇咳机制。方法 采用反相高效液相-荧光检测(RP-HPLC-FLD)法,以磷酸可待因为对照药,测定右美沙芬对小鼠脑部 5 种单胺类神经递质含量的影响。结果 右美沙芬的镇咳机制与单胺类神经递质 5-HT 有关,右美沙芬组的 5-HT 含量比空白组增加了 43.50%, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)含量比空白组增加 35.00%, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 右美沙芬镇咳作用与小鼠脑部 5-HT 的释放有关。

**关键词** 右美沙芬; 5-羟色胺; 神经递质; 镇咳; 高效液相-荧光检测法

中图分类号 R971.2; R965 文献标识码 A 文章编号 1004-0781(2012)04-0423-04

### Influences of Dextromethorphan on Monoamine Neurotransmitter 5-HT in Mouse Brain

LI Ying-chun<sup>1</sup>, ZHANG Jiu-liang<sup>2</sup>, ZHOU Li-hong<sup>1</sup> (1. Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Wuhan Steel Group, Wuhan 430085, China; 2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

**ABSTRACT** **Objective** To study the antitussive mechanism of dextromethorphan. **Methods** By using reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) with fluorescent light detector, we detected the effect of dextromethorphan on the contents of five kinds of monoamine neurotransmitters in mouse brain with codeine phosphate serving as a positive drug.

**Results** The results indicated that the antitussive mechanism of dextromethorphan was concerned with monoamine neurotransmitter 5-HT. In the dextromethorphan group, 5-HT was 43.50% higher than in the blank group ( $P < 0.01$ ), and 5-HIAA was 35.00% higher than in the blank group ( $P < 0.05$ ). Dextromethorphan could increase the content of 5-HT in mouse brain to induce antitussive effects, while the antitussive effects of codeine phosphate had no relationship with serotonergic mechanisms.

**Conclusion** The antitussive mechanism of dextromethorphan is related with the release of monoamine neurotransmitter 5-HT in mouse brain.

**KEY WORDS** Dextromethorphan; 5-Hydroxytryptamine; Neurotransmitter; Antitussive; RP-HPLC-FLD

镇咳药物根据镇咳作用的机制不同大体可以分为中枢性镇咳药和外周性镇咳药<sup>[1-2]</sup>。5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)能机制是中枢性镇咳药镇咳作用机制的一个重要组成部分, 此类机制的镇咳药通过间接与突触后 5-HT 受体相互作用以促进 5-HT 的释

放,从而达到镇咳目的<sup>[3]</sup>。右美沙芬是目前临床上应用最广的镇咳药物之一,作用与可待因相似或较强,为阿片受体激动药左啡诺的右旋异构体,但不产生依赖性和耐受性。国外已经有文献报道,右美沙芬镇咳作用可能与促进中枢尤其是孤束核中的 5-HT 的释放有关<sup>[4-5]</sup>,中枢 5-HT 的释放在镇咳药物的作用机制中起着重要作用。5-HT 能镇咳药主要影响脑部 5-HT 含量,其他神经递质含量虽有一定改变,但其与镇咳作用无明显的量效关系。右美沙芬相关镇咳机制研究在国内文献笔者尚未见报道。为了深入研究右美沙芬的镇咳机制,笔者参照反相高效液相色谱-荧光检测(RP-HPLC-FLD)法<sup>[6-10]</sup>测定其对小鼠脑部单胺类神经递质 5-HT 释放的影响,

收稿日期 2011-09-01 修回日期 2011-09-26

**作者简介** 李迎春(1973-),女,湖北应城人,主管药师,从事医院药学工作。电话: 027-86213137, E-mail: Jianglin410@163.com。

**通讯作者** 张久亮,男,讲师,博士,研究方向:天然活性成分研究与开发。电话: 027-87282111, E-mail: zjl\_ljz@yahoo.com.cn。

从动物组织水平探讨右美沙芬的镇咳作用机制。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,雌雄各半,体质量 24 ~ 28 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

1.2 试剂与药品 盐酸 5-羟色胺(5-HT)、盐酸多巴胺(dopamine, DA)、3-甲氧基-4-羟基苯乙二醇(3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol, MHPG)、5-羟基吲哚乙酸(5-hydroxyindole acetic acid, 5-HIAA),均购于美国 Sigma 公司;盐酸去甲肾上腺素(norepinephrine, L-NE, 购于美国 Fluka 公司);磷酸可待因(国药集团工业有限公司,批号:051004);氢溴酸右美沙芬(广州白云山光华制药股份有限公司,批号:050901);甲醇(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司),其他试剂均为分析纯产品。

1.3 仪器 Thermo Hypersil ODS-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱;SHIMADZU 预柱;L-2130 高效液相色谱仪、L-2485 荧光检测器(HITACHI);Neofuge13R 高速冷冻离心机(HealForce 公司);WH-2 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 动物分组与样品处理 取体质量为 24 ~ 28 g 的健康小鼠 30 只,雌雄各半,随机分为 3 组,每组 10 只,分别为:空白组[给予 0.5% 羧甲基纤维素钠(sodium carboxyl methyl cellulose, CMC-Na)溶液]、磷酸可待因组(给予磷酸可待因溶液 35 mg · kg<sup>-1</sup>)、氢溴酸右美沙芬组(给予氢溴酸右美沙芬 35 mg · kg<sup>-1</sup>)。小鼠被置于室温(25.0 ± 0.5) °C 条件下饲养,不限饮水和进食,每天早上固定时间给予灌胃给药,连续给药 10 d。小鼠末次给药后禁食 12 h,断头处死,在冰台上迅速取出全脑,用低温 0.9% 氯化钠溶液不断冲洗,除去血液,滤纸拭干称定质量;在每个脑组织中加入冷的酸性正丁醇 1.25 mL 制成匀浆液,再涡旋 2 min 后,置冷冻离心机内以 13 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 20 min;取上清液加正庚烷 0.5 mL 和 pH 7.2 的磷酸缓冲液 0.5 mL 充分混合,再以 13 000 r · min<sup>-1</sup> 二次离心 20 min;取下层水相溶液定容至 0.5 mL 得样品溶液。将样品溶液贮存于 -20 °C 冰箱中,样品保证在 24 h 内测定。

2.2 色谱条件 色谱柱:Thermo Hypersil ODS-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);预柱:SHIMADZU;柱温:35 °C;荧光检测器:检测波长 λ<sub>Em</sub> = 315 nm, λ<sub>Ex</sub> = 280 nm;流速:1.0 mL · min<sup>-1</sup>;进样量:20 μL。标准品和小鼠脑部样品色谱图见图 1。由于空白小鼠脑部标本中均存在以上生物胺,故无空白标本色谱图,所得高效液相色谱图清晰,分离效果良好。

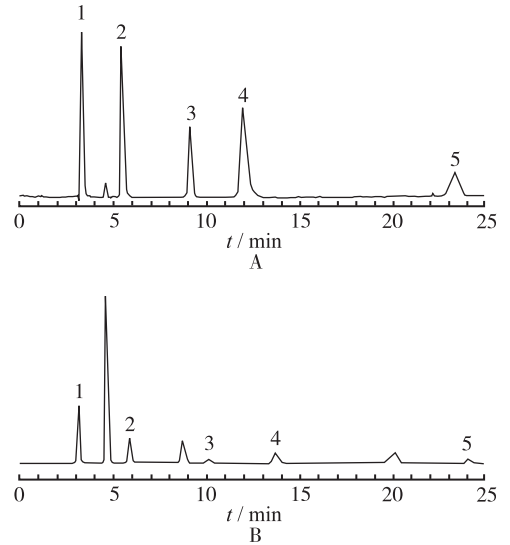


图 1 标准品(A)和样品(B)HPLC 色谱图

1. L-NE;2. DA;3. MHPG;4. 5-HT;5. 5-HIAA

Fig. 1 The HPLC chromatogram of standard substance (A) and sample (B)

1. norepinephrine; 2. dopamine; 3. 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol; 4. 5-hydroxytryptamine; 5. 5-hydroxyindoleacetic acid

2.3 流动相配制 将 0.02 mol · L<sup>-1</sup> 的柠檬酸三钠(内含 0.1 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA)用冰醋酸调至 pH 5.1,取该缓冲液与甲醇按 94 : 6 比例混合即可经孔径 0.45 μm 的微孔滤膜过滤,临用前超声脱气 30 min。

2.4 系统适用性实验

2.4.1 线性关系考察 分别精密称取标准品 L-NE 3.0 mg、DA 2.0 mg、MHPG 1.0 mg、5-HT 2.0 mg、5-HIAA 4.0 mg,分别用 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸溶解并定容至 10 mL,从中再分别吸取 200 μL 混合,用 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸稀释至 1 000, 2 000, 2 500, 4 000, 5 000, 8 000, 10 000 倍,分别精密吸取 20 μL 进样。以吸收峰面积对浓度作线性回归,可得 5 种递质的回归方程及线性范围。结果见表 1。

表 1 标准品的线性关系

Tab. 1 The linear relationship of standard substance

样品	回归方程	R <sup>2</sup>	线性范围/ (μg · mL <sup>-1</sup> )
L-NE	Y=5 649.8X+4 509.4	0.998 9	0.03 ~ 0.30
DA	Y=4 513.8X+6 564.6	0.996 9	0.02 ~ 0.20
MHPG	Y=5 349.4X+14 636.0	0.996 8	0.01 ~ 0.10
5-HT	Y=8 171.3X-11 801.0	0.997 9	0.02 ~ 0.20
5-HIAA	Y=3 361.7X-10 812.0	0.997 0	0.04 ~ 0.40

2.4.2 精密度实验 取稀释至 2 000, 4 000, 10 000

倍的混合标准液,分装后贮存于-20℃冰箱内。一天内连续测量5次,计算日内精密度。每份样本每天定时测量1次,连续测定5d,计算日间精密度。结果见表2。

表2 精密度实验结果

Tab.2 The result of precision experiment

样品	浓度/ (ng·mL <sup>-1</sup> )	$\bar{x}\pm s, n=5$			
		日内精密度		日间精密度	
		检测值/ (ng·mL <sup>-1</sup> )	RSD/ %	检测值/ (ng·mL <sup>-1</sup> )	RSD/ %
L-NE	150	153.55±3.68	2.40	149.14±2.32	1.56
	75	76.48±2.77	3.62	77.31±2.49	3.22
	30	29.12±1.10	3.78	29.66±1.22	4.11
DA	100	102.93±2.78	2.70	103.89±2.43	2.34
	50	48.71±1.76	3.62	49.36±1.42	2.88
	20	21.46±0.57	2.66	19.38±0.76	4.00
MHPG	50	52.13±1.22	2.34	51.82±1.53	2.95
	25	23.11±0.76	3.31	24.44±0.49	2.00
	10	11.13±0.32	2.88	10.96±0.25	2.28
5-HT	100	104.53±2.21	2.11	105.34±3.20	3.04
	50	47.21±1.78	3.38	48.29±1.82	3.77
	20	19.83±0.34	1.71	8.98±0.28	1.48
5-HIAA	200	204.55±3.25	1.59	205.87±4.37	2.12
	100	98.45±4.04	4.07	97.36±2.95	3.03
	40	38.48±0.94	2.44	37.86±0.78	2.06

2.4.3 稳定性实验 按“2.1”项下处理得到样品溶

液,将样品溶液分装后置于低温冰箱中。分别在2,4,8,16,24h后取出样品,低温融解后进样测定。结果表明L-NE、DA、5-HT、MHPG、5-HIAA峰面积的RSD均<5%,因此样品溶液在-20℃下24h内测定是稳定的。

2.4.4 加样回收率 取已知含量的样品溶液3份,分别加入高、中、低浓度混合标准品溶液,涡旋混匀,按拟定方法进样测定,计算加样回收率,回收率结果满足生物样品分析要求。结果见表3。

2.4.5 重复性实验 取一定量样品溶液,按拟定方法重复测定5次,L-NE、DA、5-HT、MHPG、5-HIAA的RSD值分别为1.52%,3.74%,3.62%,4.09%,3.21%,均<5%,表明重复性良好。

2.5 样品含量测定 按“2.1”项的方法取各组小鼠脑组织,处理得各样品溶液。取各样品溶液20μL注入液相色谱仪,根据测得的峰面积按回归方程计算5种神经递质的含量。

2.6 统计学方法 将实验测得的各组数据以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,用SAS软件包进行组间显著性t检验,P<0.05表示差异有统计学意义。

2.7 结果 见表4。可以看出,磷酸可待因组、氢溴酸右美沙芬组中,小鼠脑部L-NE和DA含量与空白组相比虽然有所增加,但差异无统计学意义(P>0.05),MHPG含量与空白组接近;氢溴酸右美沙芬组的5-HT含量比空白组增加43.5%(P<0.01),5-HIAA含量比空白组增加35.0%(P<0.05);磷酸可待因组的5-HT

表3 加样回收率实验结果

Tab.3 The result of the average recovery experiment

样品	样品浓度	加入浓度 (ng·mL <sup>-1</sup> )	测定值	回收率	平均回收率 %	RSD
		75.00	170.08	99.84		
		37.50	129.57	97.52		
DA	150.62	100.00	245.56	97.98	93.47	3.98
		50.00	184.62	92.02		
		25.00	158.80	90.42		
MHPG	13.21	50.00	55.86	88.37	89.01	3.17
		25.00	32.94	86.21		
		12.50	23.77	92.45		
5-HT	95.08	100.00	163.22	83.67	86.51	3.80
		50.00	131.78	90.83		
		25.00	102.12	85.04		
5-HIAA	72.05	200.00	248.23	91.24	87.91	4.87
		100.00	155.16	90.18		
		50.00	100.46	82.31		

表 4 右美沙芬对小鼠脑部 5 种神经递质的影响

Tab. 4 Effects of dextromethorphan on five kinds of monoamine neurotransmitters in mice's brain

ng · nL<sup>-1</sup>,  $\bar{x} \pm s$ , n = 10

组别	5-HT	L-NE	DA	MHPG	5-HIAA
氢溴酸右美沙芬组	235.19±28.21 <sup>*1</sup>	142.79±23.72	327.00±51.91	27.47±6.1	28.50±6.10 <sup>*2</sup>
磷酸可待因组	199.50±31.87	143.68±26.76	321.32±51.77	18.95±5.43	22.04±5.48
空白组	163.84±22.05	138.18±20.23	280.14±43.66	20.47±2.28	21.11±5.61

与空白组比较, <sup>\*1</sup>P<0.01, <sup>\*2</sup>P<0.05Compared with blank group, <sup>\*1</sup>P<0.01, <sup>\*2</sup>P<0.05

含量与空白组比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 5-HIAA 含量与空白组比较亦差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

本实验采用 RP-HPLC-FLD 法, 以磷酸可待因为对照药, 测定了右美沙芬对小鼠脑部 5 种单胺类神经递质含量的影响, 以研究右美沙芬的镇咳机制。

本实验研究结果显示: 右美沙芬能增加小鼠脑部的 5-HT 及其代谢物 5-HIAA 的含量, 而对其他 3 种单胺类神经递质无明显影响。5-HT 能镇咳药的镇咳机制就是通过间接与突触后 5-HT 受体相互作用以促进 5-HT 的释放。表明磷酸可待因的镇咳效应与 5-羟色胺能机制无关; 而氢溴酸右美沙芬的镇咳机制与单胺类神经递质 5-HT 有关, 它能增加小鼠脑部 5-HT 的含量以达到镇咳效应。此研究结果证实右美沙芬的镇咳机制与可待因不同, 这可能是右美沙芬具有良好镇咳作用又不具备身体依赖性和耐受性的原因。

#### 参考文献

- [1] 苏桂兰, 王薇. 中枢性与末梢性镇咳药[J]. 中国药店, 2002, 18(9): 89.
- [2] DICPINIGAITIS P V. Potential new cough therapies [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2004, 17(6): 459-462.
- [3] KAMEI J. Role of opioidergic and serotonergic mechanisms

in cough and antitussives [J]. Pulm Pharmacol, 1996, 9(5-6): 349-356.

- [4] KAMEI J, HOSOKAWA T, YANAURA S, et al. Involvement of central serotonergic mechanisms in the cough reflex [J]. Jan J Pharmacol, 1986, 42(4): 531-538.
- [5] KAMEI J, MORI T, IGARASHI H, et al. Serotonin release in nucleus of the solitary tract and its modulation by antitussive drugs [J]. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1992, 76(3): 371-374.
- [6] 王静, 王丽霞, 聂克. 连翘对化疗性异食癖大鼠血清和脑组织 5-HT 及 5-HIAA 含量的影响[J]. 山东中医杂志, 2010, 29(10): 702-703.
- [7] 鲁燕侠, 崔佳, 蔺兴遥, 等. RP-HPLC-荧光检测法测定小鼠脑组织中 5 种神经递质的含量[J]. 解放军药学报, 2003, 19(4): 262-264.
- [8] 谢笑龙, 杨丹莉, 李志梅, 等. 大鼠脑内儿茶酚胺类递质及其代谢物的同时提取及反向高效液相测定法[J]. 遵义医学院学报, 2004, 27(5): 447-449.
- [9] 张向晖, 刘军, 苏林雁. 库仑阵列电化学高效液相色谱法测定大鼠脑组织中单胺类神经递质及代谢产物[J]. 医学临床研究, 2007, 24(1): 1-3.
- [10] 陈本美, 夏令伟, 梁绍先, 等. 高效液相色谱法测定小鼠脑组织单胺递质及其相关化合物[J]. 分析化学研究报告, 1999, 27(3): 249-253.

DOI 10.3870/yydb.2012.04.005

## 热烈祝贺《医药导报》入选中文核心期刊

经过文献计量学对期刊的相关数据进行统计与分析及同行专家评议,《医药导报》荣幸入选 2012 年版《中文核心期刊要目总览》医学综合类中文核心期刊。我们将以本刊入选中文核心期刊为新的起点, 制订更加严格的编辑操作规程, 与广大读者、作者、编委、顾问、审稿专家一道共同努力, 进一步提高期刊质量, 将《医药导报》办得更加贴近读者, 贴近实际。

《医药导报》编辑部