

# 甘遂不同炮制品及提取物对斑马鱼的急性毒性研究

曹雨诞, 李征军, 陈海鹰, 张丽\* (南京中医药大学, 南京 210046)

**摘要:** 目的 以模式生物斑马鱼为实验对象, 评价甘遂不同炮制品及提取方法的急性毒性。方法 采用回流提取方法制备甘遂不同炮制品的水提液和醇提液; 将它们的提取液按几何级数设置浓度梯度, 添加到鱼生活的水中, 观察给药后 96 h 鱼只的死亡情况, 以此为判断待测药物毒性大小的依据, 采用 SPSS Statistics 17 软件计算不同炮制品水提液和醇提液对斑马鱼的半数致死浓度(LC<sub>50</sub>)。结果 斑马鱼对甘遂不同炮制品的水提液和醇提液均表现出急性毒性反应, 且毒性作用呈现出明显的量-毒关系; 不同炮制品水提液 LC<sub>50</sub> 明显高于相应醇提液; 同一提取方法不同炮制品的急性毒性大小顺序为甘遂生品>清炒品>醋润品>醋炙品。结论 以斑马鱼作为实验动物, 甘遂生品的醇提液急性毒性最强、甘遂醋炙品的水提液急性毒性最低。本实验为进一步认识与评价甘遂毒性及醋炙减毒机制提供了依据。

**关键词:** 甘遂; 不同炮制品; 提取方法; 斑马鱼; 急性毒性

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2013)01-0140-04

## Acute Toxicity of Different Processed Kansui and its Extrats on Zebrafish

CAO Yudan, LI Zhengjun, CHEN Haiying, ZHANG Li\* (Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To evaluate the acute toxicity of different processed kansui and its extraction on the model organism, zebrafish. **METHODS** Different processed kansui water extracts and alcohol extracts were prepared by reflux extraction method. The death of zebrafish was observed after exposure for 96 h to different processed kansui extracts with different concentration stages, which was the judgment for drug toxicity basis. The half lethal concentrations (LC<sub>50</sub>) of different processed kansui extracts on zebrafish were calculated by SPSS Statistics 17. **RESULTS** Zebrafish in different processed kansui extracts all had acute toxicity reaction and showed apparent dose-toxicity relationship. Different processed kansui water extracts were significantly higher than alcohol extracts. Their order of toxicity from high to low was: the crude kansui, simple stir-baking kansui, kansui infiltrated with vinegar, and kansui stir-baked with vinegar. **CONCLUSION** With zebrafish as experimental animals, the crude kansui alcohol extract shows the highest toxicity, whereas kansui stir-baked with vinegar water exteact is lowest. The results provide evidence for the further understanding and evaluation on the toxicity of kansui and attenuated mechanism after vinegar processing.

**KEY WORDS:** Kansui; different processed products; extracting method; zebrafish; acute toxicity

甘遂为大戟科(Euphorbiaceae)大戟属(Euphorbia genus)植物甘遂(*Euphorbia Kansui* T.N.Liou ex T.P.Wang)的干燥块根<sup>[1]</sup>, 因其味微甘而主攻逐, 故名甘遂, 遂者坠也。甘遂苦、寒, 有毒, 始载于《神农本草经》, 列为下品。《本草纲目》列入草部毒草类。甘遂为重要峻下逐水药, 具有泻水逐饮、破积通便的功能, 主治水肿胀满, 胸腹积水, 风痰癫痫, 气逆喘咳, 二便不利。现代药理研究表明, 甘遂既具有抗肿瘤、抗流感病毒及 HIV 病毒等多种药理活性, 同时又对口腔、胃肠道及皮肤有严重的刺激性, 以及致炎、促发肿瘤等多种毒性<sup>[2-4]</sup>。

斑马鱼(*Brachydanio rerio*)是一种亚热带淡水

鱼类<sup>[5]</sup>, 具有体积小、繁殖快、易于培养、成本低等特点; 同时易于给药、容易观察。随着胚胎学和遗传学技术发展及基因测定的逐步完善, 发现斑马鱼器官与人器官在结构、生理、分子水平等方面惊人地相似, 其和人类的基因组相似度与小鼠相当, 且在蛋白质水平上, 其关键部位的同源性几乎是 100%, 使其迅速成为脊椎动物中最适于做发育生物学和遗传学研究的模式生物<sup>[6]</sup>, 同时也成为最有希望的毒理模式脊椎动物<sup>[7-8]</sup>。目前, 国内外已经广泛将斑马鱼应用于急、慢性毒性实验的高通量筛选<sup>[9]</sup>。

甘遂的毒性较强, 必须通过炮制来降低毒性, 临床上也必须经炮制后给药。本实验拟利用模式

作者简介: 曹雨诞, 女, 硕士, 讲师 Tel: (025)85811519 E-mail: raindc@163.com \*通信作者: 张丽, 女, 博士, 教授 Tel: (025)85811519 E-mail: zhangliguanxiang@163.com

生物斑马鱼,对甘遂生品、清炒品、醋润品和醋炙品及其不同提取方法提取液的急性毒性大小和其量-毒关系进行考察,为进一步认识与评价甘遂毒性及醋炙减毒机制提供依据。

## 1 实验材料

### 1.1 药材

甘遂采自陕西省宝鸡赤沙乡,经南京中医药大学王春根教授鉴定为大戟科大戟属植物甘遂的干燥块根。

### 1.2 动物

斑马鱼,购于南京市夫子庙花鸟市场,平均体长 2 cm,平均体重 0.25 g,♀♂不限。在水族箱适应性饲养(饲料为斑马鱼专用饲料)1周,健康无病,未见死亡,用于实验<sup>[10]</sup>。

## 2 方法与结果

### 2.1 方法

**2.1.1 甘遂不同炮制品的制备** 甘遂生品:取生甘遂,大小分档,除去杂质。甘遂清炒品:取净甘遂,将炒锅加热到 260℃左右,不断翻炒,9 min后出锅,放凉。甘遂醋润品:取净甘遂,加醋拌匀,闷透,待醋被吸尽后,晾干。每 100 kg 用醋 30 kg。甘遂醋炙品:取净甘遂,加醋拌匀,闷透,待醋被吸尽后,将炒锅加热到 260℃左右,不断翻炒,9 min后出锅,放凉。每 100 kg 用醋 30 kg。颜色加深,略有焦斑。

**2.1.2 甘遂不同炮制品水提液和醇提液的制备** 称取 50 g 甘遂生品,洗净、粉碎过筛,用 10 倍量的水回流提取 2 次,提取液减压浓缩至含生药 50 mg·mL<sup>-1</sup>,得甘遂生品水提液;同样按上述方法,制备得甘遂生品醇提液(用 10 倍量的 95%乙醇回流提取 2 次,回收至无醇味,加水稀释至含生药 50 mg·mL<sup>-1</sup>)。

甘遂各炮制品及其提取液的制备方法同上。

**2.1.3 动物预实验确定剂量范围** 斑马鱼购回后,适应性饲养 1 周,每天喂食并清理缸底粪便和残余饵料,试验前 24 h 停止喂食。实验方法采用静水实验法<sup>[11]</sup>,以 96 h 为 1 个试验周期。预试验在装有 2 L 水的烧杯中进行,设定 5~6 个浓度范围进行试验,观察 96 h 内鱼反应,以鳃盖是否停止活动,和对轻微刺激有无反应作为判断依据。当斑马鱼中毒停止呼吸以后,俯卧或侧卧于盆底鳃盖停止活动,用小镊子夹鱼尾柄部,5 min 内无反应即可以确定为个体死亡<sup>[12]</sup>。

**2.1.4 甘遂不同炮制品水提液和醇提液急性毒性测定** 根据预实验得出的范围,按照几何级数梯度设定 8 个试验浓度组。每个浓度设 1 个平行组,另设清水空白对照组 1 个,共计 9 组。试验时挑选健康活泼的成年斑马鱼投入已经加入药液的烧杯中,每个烧杯随机投入 10 条,整个试验期间不喂食,以避免饲料的影响,实验室温度控制在(24±1)℃,24 h 换 1 次药。试验开始后持续观察,发现鱼只死亡及时捞出,并作试验记录,直至 96 h 结束观察,进行数据统计与分析<sup>[10]</sup>。

**2.1.5 数据分析** 实验结果采用 SPSS Statistics 17 软件进行统计分析,计算甘遂不同炮制品醇提液对斑马鱼的半数致死浓度(LC<sub>50</sub>)。

### 2.2 结果

**2.2.1 预实验结果** 甘遂不同炮制品水提液和醇提液 96 h 全部死亡的最小剂量和无死亡的最大剂量,结果见表 1。

表 1 甘遂不同炮制品及其提取液 96 h 全部死亡的最小剂量和无死亡的最大剂量预实验结果

Tab 1 The pre-experimental results in 96 h of the different doses of various samples from kansui

样品	水提液/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		醇提液/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	
	LC <sub>100</sub>	LC <sub>0</sub>	LC <sub>100</sub>	LC <sub>0</sub>
甘遂生品	60	5.0	21.0	1.75
甘遂清炒品	70	12.0	32.5	3.9
甘遂醋润品	72	13.5	40.3	6.4
甘遂醋炙品	85	15.2	65.0	6.2

**2.2.2 甘遂不同炮制品及其提取液 LC<sub>50</sub> 的测定** 甘遂生品水提液预实验结果确定给药后 96 h LC<sub>100</sub> 为 60  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 96 h LC<sub>0</sub> 为 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 在该范围内按几何级数梯度设定 8 个试验浓度组以及 1 个空白对照组,精确吸取甘遂生品水提液分别放入 2 L 烧杯中,8 个烧杯中含生药浓度从低到高分别为 5, 7, 10, 14, 20, 28, 39, 60  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 实验周期结束后,统计各组死亡率<sup>[10]</sup>。采用 SPSS Statistics 17 软件计算出 LC<sub>50</sub> 为 30.985  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

甘遂生品醇提液预实验结果确定给药后 96 h LC<sub>100</sub> 为 21.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 96 h LC<sub>0</sub> 为 1.75  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 在该范围内按几何级数梯度设定 8 个试验浓度组以及一个空白对照组,精确吸取甘遂生品醇提液分别放入 2 L 烧杯中,8 个烧杯中含生药浓度从低到高分别为 1.75, 2.5, 3.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0, 21.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 实验周期结束后,统计各组死亡率<sup>[10]</sup>。

采用 SPSS Statistics 17 软件计算出  $LC_{50}$  为  $8.088 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。同样的方法, 测得甘遂各炮制品水提液和醇提液的  $LC_{50}$ , 结果见表 2。

表 2 甘遂不同炮制品水提液和醇提液的  $LC_{50}$   
**Tab 2** The  $LC_{50}$  of the water extracts and alcohol extracts from the different processed kansui

样品	水提液 $LC_{50}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	醇提液 $LC_{50}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
甘遂生品	30.985	8.088
甘遂清炒品	32.207	14.527
甘遂醋润品	32.086	17.710
甘遂醋炙品	42.984	31.334

**2.2.3 甘遂不同炮制品及其提取液的量-毒曲线关系** 根据上述甘遂生品水提液 8 个不同浓度得到的各组死亡情况, 以设定浓度的对数为横坐标, 死亡率(%)为纵坐标绘图, 得到甘遂生品水提液的量-毒曲线。同法绘制甘遂各炮制品水提液的量-毒曲线。结果见图 1。

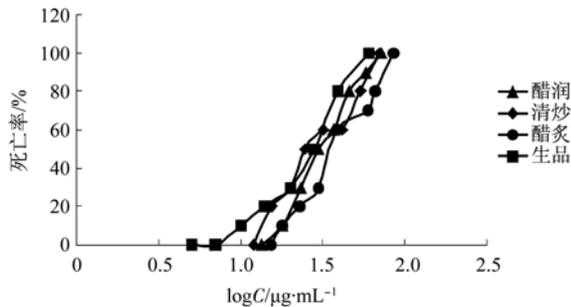


图 1 甘遂不同炮制品水提液对斑马鱼急性毒性的量-毒曲线  
**Fig 1** The curve of amount-poison of the water extracts from the different processed kansui to zebrafish

根据上述甘遂生品醇提液 8 个不同浓度得到的各组死亡情况, 以设定浓度的对数为横坐标, 死亡率(%)为纵坐标绘图, 得到甘遂生品醇提液的量-毒曲线。同法绘制甘遂各炮制品醇提液的量-毒曲线。结果见图 2。

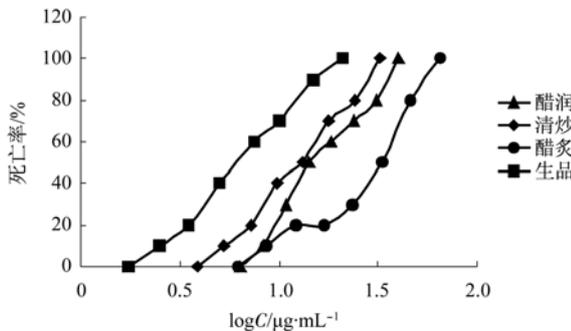


图 2 甘遂不同炮制品醇提液对斑马鱼急性毒性的量-毒曲线  
**Fig 2** The curve of amount-poison of the alcohol extracts from the different processed kansui to zebrafish

### 3 讨论

斑马鱼是国际标准化组织推荐使用的鱼类毒性试验动物, 其体形小, 是取代青蛙、果蝇、小白鼠等作为研究对象的优良试验模式鱼。许多学者利用斑马鱼作为模式生物, 研究了中药成分对斑马鱼的急性毒性。姜玮等<sup>[10]</sup>采用静水实验法研究了甘遂不同提取物对斑马鱼急性毒性, 结果发现斑马鱼对甘遂不同提取物均表现出急性毒性反应, 并呈现出明显的量-毒关系; 甘遂水提物  $LC_{50}$  为  $31.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 甘遂醇提物  $LC_{50}$  为  $6.89 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 甘遂先醇提后水提物  $LC_{50}$  为  $4.26 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。但至今未见甘遂不同炮制品提取液对斑马鱼的安全性评价实验。

在实验过程中发现, 随着药物浓度的增加, 斑马鱼在一定时间内的死亡率会相应增加, 说明药物浓度与斑马鱼的死亡率呈正相关, 因而可用鱼只的死亡率来表示药物的毒性大小。与小鼠、大鼠、犬等哺乳动物相比, 斑马鱼的体积较小, 口服或注射给药困难较大, 且国内尚未有对应的给药器<sup>[9]</sup>。因此笔者将药物加入斑马鱼所生活的水中, 通过搅拌使其均匀分散其中, 而斑马鱼会自主连续的从溶液中吸收药物, 通过调节水中药物浓度来改变给药剂量, 药物对斑马鱼的作用将随着药物浓度的变化而变化, 最后用半数致死浓度 ( $LC_{50}$ ) 来反映药物的毒性大小。

由结果可知, 甘遂生品和各炮制品醇提液均表现出一定的急性毒性, 同一炮制品水提液的  $LC_{50}$  显著高于其相应的醇提液。这是由于甘遂中的二萜类成分为其毒效部位<sup>[13]</sup>, 而该类成分水溶性较差, 在水提液中含量很少, 所以水提液毒性偏小; 但该类成分的醇溶性较好, 在醇提液中含较高, 因此甘遂醇提液毒性显著大于其水提液。

由结果可知, 甘遂不同炮制品提取液对斑马鱼均有一定的急性毒性反应, 并分别呈现出明显的量-毒关系。甘遂不同炮制品提取液对斑马鱼的急性毒性大小顺序为: 甘遂生品 > 甘遂清炒品 > 甘遂醋润品 > 甘遂醋炙品; 其毒性大小顺序和各炮制品中二萜类成分的含量高低一致<sup>[14]</sup>。结合二萜类成分的毒性, 推测二萜类成分的含量变化与甘遂醋炙减毒有一定的关联性。实验结果提示在甘遂醋炙过程中加热和醋润 2 个炮制程序能够起到降低甘遂急性毒性的协同作用, 为进一步阐明甘遂醋炙减毒机制奠定了重要的基础。

## REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版.一部)[S]. 2010: 81.
- [2] ZHENG W F. Study on *in vivo* antiviral activity of four diterpenoids from ethanol extracts of *Euphorbia kansui* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2004, 35(1): 65-68.
- [3] ZHENG W F, CHEN C F, ZHU A H, et al. Screening for antiviral fractions from ethanol extract of *Euphorbia kansui* Liou [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2002, 24(5): 362-365.
- [4] SHU X Y, DING A W. Progresses in studying processing and its chemical composition, pharmacological effect of *Euphorbia kansui* [J]. J China Pharm(中国药房), 2007, 18(24): 1904-1906.
- [5] ZHENG L L, WU D S. Research and application of zebrafish in experimental animal [J]. J Nanhua Univ(Med Ed)(南华大学学报: 医学版), 2008, 36(2): 249-251.
- [6] HEIJNE W H, KIENHUIS A S, VAN OMMEN B, et al. Systems toxicology: applications of toxicogenomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics in toxicology [J]. Expert Rev Proteomics, 2005, 2(5): 767-780.
- [7] SPITSBERGEN J M, KENT M L. The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research-advantages and current limitations [J]. Toxicol Pathol, 2003, 31(Suppl): 62-87.
- [8] TERAOKA H, DONG W, HIRAGA T. Zebrafish as a novel experimental model for developmental toxicology [J]. Congenit Anom (Kyoto), 2003, 43 (2): 123-132.
- [9] WANG J J, XU C, TU Y J, et al. Experimental research and application of zebrafish and embryos in toxicology [J]. Asian J Ecotoxicology(生态毒理学报), 2007, 2(2): 123-135.
- [10] JIANG W, WANG X M, TANG Y P, et al. Preliminary observation on acute toxicity of differnt kansui extraction zebrafish [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2012, 28(1): 53-56.
- [11] UEMURA D, CHEN H. Isolation and structure of 20-deoxy-ingenol new diterpene, derivatives and ingenol derivative obtained from kansui [J]. Tetrahedron Lett, 1974, 29(15): 2527-2528.
- [12] WANG L Y, WANG N L, YAO X S, et al. Diterpenes from the roots of *Euphorbia kansui* and their *in vitro* effects on the cell division of *Xenopus* (2) [J]. Chem Pharm Bull, 2003, 51(8): 935-941.
- [13] WANG L Y. Research of chemical constituents and biological activity from *Euphorbia kansui* [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University(沈阳药科大学), 2003.
- [14] LI Z J, LI L, GAO L, et al. Change of diterpenoids in different processed products of *Euphorbia kansui* [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2011, 33(12): 95-98.

收稿日期: 2012-05-22

## 克拉霉素缓释包衣微丸的制备及体外释放度研究

柳晓蕊<sup>1,2,3</sup>, 章正赞<sup>1,2</sup>, 贺周扬<sup>1,2</sup>, 潘昕<sup>1,2\*</sup>, 吴传斌<sup>1,2\*</sup> (1.中山大学药学院, 广州 510006; 2. 广东省创新药物制剂工程技术研究中心, 广州 510006; 3.广州医学院附属肿瘤医院, 广州 510095)

**摘要:** 目的 制备克拉霉素缓释包衣微丸, 并对其体外释放度进行考察。方法 采用挤出滚圆技术制备克拉霉素含药微丸。以优化的丙烯酸树脂类 Eudragit NE30D 和 Eudragit L30D-55 混和水分散体为包衣材料, 采用流化床包衣技术, 制备缓释包衣微丸。考察自制缓释微丸的体外释药速率, 并与市售的克拉霉素缓释胶囊进行比较。结果 通过释药行为的评价, 得到优化的包衣处方为 5:1 的 Eudragit NE30D 和 Eudragit L30D-55 混和包衣材料, 其体外释放行为在不同的 pH 溶出介质中与市售制剂产品没有明显差异, 体外释药过程符合一级释放模型。结论 采用挤出滚圆和流化床技术, 以及优化的 Eudragit NE30D 和 Eudragit L30D-55 混和水分散体包衣材料, 成功制备了克拉霉素缓释包衣微丸。

**关键词:** 克拉霉素; 挤出滚圆; 流化床; 丙烯酸树脂; 缓释包衣微丸

中图分类号: R943 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2013)01-0143-05

## Preparation and *in Vitro* Release Study of Sustained-release Coated Pellets Containing Clarithromycin

LIU Xiaorui<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Zhengzan<sup>1,2</sup>, HE Zhouyang<sup>1,2</sup>, PAN Xin<sup>1,2\*</sup>, WU Chuanbin<sup>1,2\*</sup> (1.School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China; 2.Guangdong Research Center for Drug Delivery Systems, Guangzhou 510006, China; 3.Guangzhou Medical University Cancer Institute and Hospital, Guangzhou 510095, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To prepare sustained-release coated pellet containing clarithromycin, and to investigate its *in vitro* drug release behavior. **METHODS** Extrusion-spheronization technology was used to prepare clarithromycin-containing pellets. The drug contained pellets were coated with the optimized polymeric combination of Eudragit NE30D and Eudragit L30D-55 by

基金项目: 广东省创新药物制剂工程技术研究开发中心(2011B080100019)

作者简介: 柳晓蕊, 女, 硕士生 Tel: (020)39943343 E-mail: liuxiaorui1987@yahoo.cn \*通信作者: 吴传斌, 男, 博士, 教授, 博导 Tel: (020)39943060 E-mail: cbwu2000@yahoo.com 潘昕, 女, 博士, 讲师 Tel: (020)39943060 E-mail: pxin\_1385@163.com