



## 河豚毒素处方前初步研究

徐己人, 郑紫云, 李园, 鲁莹, 褚智勇

### Preliminary pre-prescription study of Tetrodotoxin

XU Jiren, ZHENG Ziyun, LI Yuan, LU Ying, CHU Zhiyong

在线阅读 View online: <http://yxj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202304024>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 镰形棘豆总黄酮理化性质及体外经皮渗透性的研究

Physicochemical properties and percutaneous penetration of total flavonoids from *Oxytropis falcata* Bunge

药学实践与服务. 2019, 37(5): 440-443,449 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.05.010

#### 肉桂预煎液中有效成分肉桂酸的稳定性研究

Study on the stability of the effective components cinnamic acid in the decoction of cinnamon

药学实践与服务. 2020, 38(3): 255-258 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202002002

#### 苦黄注射液多组分成分测定及成品的输液稳定性研究

The multi-component assay of Kuhuang injection and stability study on its infusion

药学实践与服务. 2019, 37(2): 173-176 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.02.015

#### 复方酮康唑软膏的制备与稳定性考察

Development and stability test of compound ketoconazole ointment

药学实践与服务. 2017, 35(6): 535-538,550 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.06.013

#### 复方阿达帕林软膏的制备与稳定性研究

Development and stability test of compound adapalene ointment

药学实践与服务. 2019, 37(1): 46-50,68 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.011

#### 高效液相色谱法考察8种常用对照品溶液的稳定性

The investigation of the stability of 8 commonly used reference solutions by HPLC

药学实践与服务. 2021, 39(5): 426-430 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202101025



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

## · 论著 ·

## 河豚毒素处方前初步研究

徐己人<sup>1</sup>, 郑紫云<sup>2</sup>, 李园<sup>3</sup>, 鲁莹<sup>3</sup>, 储智勇<sup>1,2</sup> (1. 上海海洋大学, 上海 201306; 2. 江苏中洋集团股份有限公司, 江苏 海安 226600; 3. 海军军医大学药理学系, 上海 200433)

**[摘要]** 目的 考察河豚毒素(TTX)在不同溶剂中的溶解性及稳定性, 以及温度和 pH 值对稳定性的影响。方法 配制 TTX 不同介质的溶液, 采用高效液相色谱法(HPLC)测定其在不同温度、不同 pH 缓冲液中的浓度, 分析计算其溶解度及稳定性。结果 TTX 在 pH 值为 3.5 时溶解度最大, 随着 pH 值增加其溶解度逐渐降低。TTX 在强碱条件下降解最为迅速, 在 70 °C 条件下、0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液中, 20 min 即完全降解。稳定性试验结果同样证明 TTX 在碱性条件下的稳定性最差, 在 37 °C、pH 值=7.4 的磷酸缓冲盐溶液(PBS)中, TTX 浓度在 1~10 h 时开始持续降低, 28 天降解率为 88.07±0.27%。结论 TTX 易溶于 pH 值=3.5 的酸性水溶液, 几乎不溶于碱性水溶液。其稳定性与温度、介质 pH 值密切相关, 在酸性水溶液中较为稳定, 在碱性条件下易降解, 温度升高会加速其降解过程。

**[关键词]** 河豚毒素; HPLC; 稳定性; 溶解度

**[文章编号]** 2097-2024(2023)09-0544-03

**[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202304024

## Preliminary pre-prescription study of Tetrodotoxin

XU Jiren<sup>1</sup>, ZHENG Ziyun<sup>2</sup>, LI Yuan<sup>3</sup>, LU Ying<sup>3</sup>, CHU Zhiyong<sup>1,2</sup> (1. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Jiangsu Zhongyang Group Co., Ltd., Hai'an 226600, China; 3. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the solubility and stability of Tetrodotoxin (TTX) in different solvents, and the effect of temperature and pH on its stability. **Method** Solutions of TTX in different matrices were prepared. Their concentrations at different temperatures and pH buffers were determined by high performance liquid chromatography and their solubility and stability were analyzed and calculated. **Result** TTX was most soluble at pH 3.5 and its solubility decreased as the pH increased. TTX degraded most rapidly under strong alkali conditions, with complete degradation after 20 min of reaction at 0.1 mol/L sodium hydroxide and 70 °C. The stability test results similarly demonstrated that TTX was least stable under alkaline conditions. In a PBS buffered solution at 37 °C, pH 7.4, TTX concentration began to decrease consistently at 1~10h, with a degradation rate of 88.07±0.27% after 28 days. **Conclusion** TTX is readily soluble in acidic aqueous solutions at pH 3.5 and almost insoluble in alkaline aqueous solutions. Its stability is closely related to the temperature and pH of the medium. It is more stable in acidic aqueous solutions and easily degrades under alkaline conditions, and its degradation process could be accelerated by increasing temperature.

**[Key words]** Tetrodotoxin; HPLC; Stability; Solubility

河豚毒素(TTX)属于氨基全氢化喹啉化合物, 分子式为 C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>O<sub>8</sub>N<sub>3</sub>, 分子量为 319。其分子结构类似于生物碱<sup>[1]</sup>, 呈独特的笼形, 如图 1。河豚毒素粗品为黄褐色粉末, 纯品为白色晶体, 呈弱碱性, 容易潮解, 微溶于水溶液, 易溶于无机酸水溶液, 且在弱酸条件下稳定; 对于热不敏感, 但在高温下毒性会增强, 强酸强碱条件下其结构可被破坏<sup>[2]</sup>。

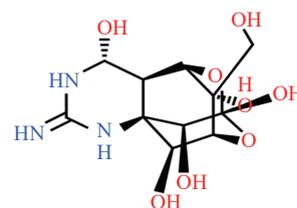


图 1 河豚毒素结构式

河豚毒素是一种高效的神经类毒素, 由于能够特异性的阻断 Na<sup>+</sup>离子通道, 进而产生麻痹作用, 因此低浓度的河豚毒素被认为是一种优良的神经类候选药物, 一直受到科研人员尤其是新药研发人员的关注<sup>[3]</sup>。目前已有将河豚毒素作为止痛药<sup>[4-5]</sup>

**[作者简介]** 徐己人, 本科生, Email: MikuMiyo@hotmail.com, Tel: 18121451808

**[通信作者]** 储智勇, 博士, 研究方向: 海洋药物, Email: zhiyongchu87@163.com

和成瘾戒断药<sup>[6]</sup>的相关探索和研究。由于河豚毒素在药学领域有着广阔前景,关于其药学应用的研究报道逐年增多,但大多集中在分析方法<sup>[7]</sup>、药理机制<sup>[8]</sup>或药物载体研究<sup>[9]</sup>,对其可成药性的相关研究报道较少。本文按照新药研发要求,建立高效液相反相离子对色谱法,对河豚毒素在不同溶剂中的溶解性和不同 pH 环境中的稳定性进行考察,为河豚毒素的处方前研究积累数据,为其进一步临床应用提供有力支撑。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-2030C 高效液相色谱仪(日本岛津制作所); AL-104 电子天平(METTLER TOLEDO, 瑞士); 数显 pH 计(sartorius, 德国); 紫外可见分光光度计(安捷伦科技(中国)有限公司); 循环水式真空泵(上海豫康科教仪器设备有限公司); SECURA125-1CN 型十万分之一电子天平(赛多利斯, 德国); Arium@ mini 超纯水机(赛多利斯, 德国)。

### 1.2 试剂

河豚毒素原料药(中洋生物科技江苏有限公司, 批号: 20220089, 含量 88%); 河豚毒素对照品(泰州康特生物工程有限公司, 批号: 201206, 含量  $\geq 99\%$ ); 磷酸、98% 甲酸、柠檬酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氢氧化钠、庚烷磺酸钠、磷酸二氢铵、乙酸铵、盐酸、30%  $H_2O_2$  和冰醋酸均为分析纯试剂(国药集团化学试剂有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Shim-pack GISIC18-AQ(4.6 $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m); 流动相为 5 mmol/L 庚烷磺酸钠-25 mmol/L 磷酸二氢铵, 等度洗脱; 进样量为 10  $\mu$ l; 柱温: 25  $^{\circ}$ C; 流速 1 ml/min; 检测波长为 196 nm; 检测时长为 40 min。

### 2.2 对照品储备液的制备

取 TTX 对照品适量, 精密称定, 用 0.1% 磷酸溶液溶解并稀释制成浓度为 1.0 mg/ml 的 TTX 对照品储备液。

### 2.3 供试品储备液的制备

取 TTX 原料药适量, 精密称定, 用 0.1% 磷酸溶液溶解并稀释制成浓度为 1.0 mg/ml 的供试品储备液。

### 2.4 溶解度试验测试溶液的制备

按照《中国药典》(2020 版) 四部通则 8004 缓

冲液配制方法, 配制 pH 值分别为 3.5、4.5、5.0、6.5、7.0、7.4、8.0 的缓冲液<sup>[10]</sup>。称取研成细粉的 TTX 原料药各 2 mg, 分别置于 4 ml 不同 pH 值的缓冲液(25 $\pm$ 2  $^{\circ}$ C)中, 30 min 内每隔 5 min 强力振摇 30 s, 观察溶解情况, 如无目视可见颗粒, 视为完全溶解。如完全溶解则继续加入研成细粉的 TTX 原料药, 同法操作直至饱和, 取适量经滤膜滤过, 作为溶解度试验测试溶液。

### 2.5 强酸与强碱破坏试验测试溶液的制备

取研成细粉的 TTX 原料药约 1 mg, 置于 10 ml 容量瓶中, 分别用 0.1 mol/L 盐酸和 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液溶解并定容, 置于 70  $^{\circ}$ C 下反应 20 min。精密量取各反应溶液适量, 冷却至室温, 分别加入对应体积的 0.1 mol/L 氢氧化钠或 0.1 mol/L 盐酸进行中和并终止反应。取适量样品经滤膜过滤后作为强酸与强碱破坏试验测试溶液。

### 2.6 氧化破坏试验测试溶液的制备

取研成细粉的 TTX 原料药约 1 mg, 置于 10 ml 容量瓶中, 加入 30%  $H_2O_2$  溶液溶解定容后, 室温反应 10 min。精密量取反应溶液适量, 经滤膜过滤, 作为氧化破坏试验测试溶液。

### 2.7 稳定性试验测试溶液的制备

取研成细粉的 TTX 各适量, 精密称定, 分别用 PBS 缓冲液(pH 值=7.4)、0.1% 甲酸溶液、0.1% 柠檬酸溶液溶解, 并稀释制成浓度为 0.1 mg/ml 的 TTX 溶液, 然后分别置于 4  $^{\circ}$ C、25  $^{\circ}$ C、37  $^{\circ}$ C 中储存, 在第 1、2、3、5、7、14、21、28 d 各取适量经滤膜过滤, 作为温度适应性测试溶液。

## 3 结果

### 3.1 方法学验证结果

#### 3.1.1 系统适用性

分别将对对照品储备液及供试品储备液用 0.1% 磷酸溶液稀释至 0.1 mg/ml, 作为对照品溶液和供试品溶液, 按“2.1”项进行测试。如图 2 所示, TTX 的保留时间为 22.665 min。理论板数为 14 501, 供试品溶液中主峰与邻峰的分离度为 6.4。结果表明, 此色谱条件可以满足 TTX 相关测试要求。

#### 3.1.2 标准曲线

取对照品储备液, 用 0.1% 磷酸溶液配制浓度为 4、10、20、40、80  $\mu$ g/ml 的 TTX 对照品测试溶液, 按“2.1”项进行测试。以浓度为横坐标( $X$ ), 峰面积为纵坐标( $Y$ ), 绘制标准曲线, 得回归方程为  $Y=12\ 601.2X-2\ 263.69$  ( $r=0.999\ 9$ )。结果表明, TTX 的浓度与峰面积在测试范围内呈良好线性关系。

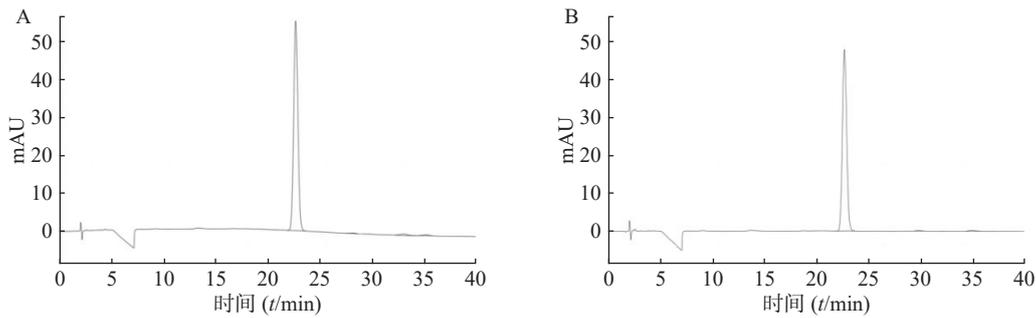


图2 TTX对照溶液(A)与供试品溶液(B)的典型色谱图

### 3.1.3 准确度与精密度

取对照品储备液,用0.1%磷酸溶液分别稀释至10、20、40 μg/ml的溶液各3份,按“2.1”项进行测试,计算其含量的平均值为101.000%,RSD为0.60%,表明该方法准确度良好,满足测试要求。

### 3.1.4 进样重复性及稳定性

取供试品溶液,按“2.1”项重复测试6次,计算得到的RSD为0.17%,表明该方法重复性良好。

室温分别放置0、2、4、6、8、10、12、24、48 h后按“2.1”进行测试。计算得到的RSD为1.48%,表明供试品溶液在48 h内稳定性良好。

### 3.2 溶解度及稳定性考察结果

#### 3.2.1 溶解度考察结果

由表1结果可看出,TTX几乎不溶于碱性水溶液,但溶解度随着pH值降低而逐渐增大,易溶于pH值为3.5的酸性水溶液。

表1 TTX在不同pH值水溶液中的溶解度

pH值	3.5	4.5	5.0	6.5	7.0	7.4	8.0
$\bar{x}$ (mg/ml)	264.63	31.35	4.64	1.02	0.47	0.21	0.05
SD(mg/ml)	5.54	0.75	0.08	0.046	0.015	0.0027	0.001

#### 3.2.2 破坏试验结果

实验结果表明,强碱对TTX的破坏能力最强,在0.1mol/L氢氧化钠溶液中、70℃条件下反应20 min后,TTX被完全降解。强酸对TTX的破坏能力次之,TTX在70℃、0.1mol/L HCl溶液中反应20 min后的降解率为60.78%;氧化对TTX的破坏能力相对最弱,在30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液中反应20 min后的降解率为17.06%。

#### 3.2.3 稳定性考察结果

不同介质、不同温度条件下TTX稳定性试验

结果见图3。当溶剂为pH值=7.4的PBS溶液时,不同温度下TTX均表现出降解趋势,在25℃与37℃条件下保存28 d的TTX溶液降解率均超过50%,在37℃时PBS溶液中的TTX降解率更高达88.07±0.27%,提示在后续剂型研究中,需注意TTX在体外释放液中的稳定性。以0.1%甲酸溶液或0.1%柠檬酸溶液为溶剂的TTX溶液则较为稳定,在25℃和37℃下保存28 d含量均未表现出显著性变化。

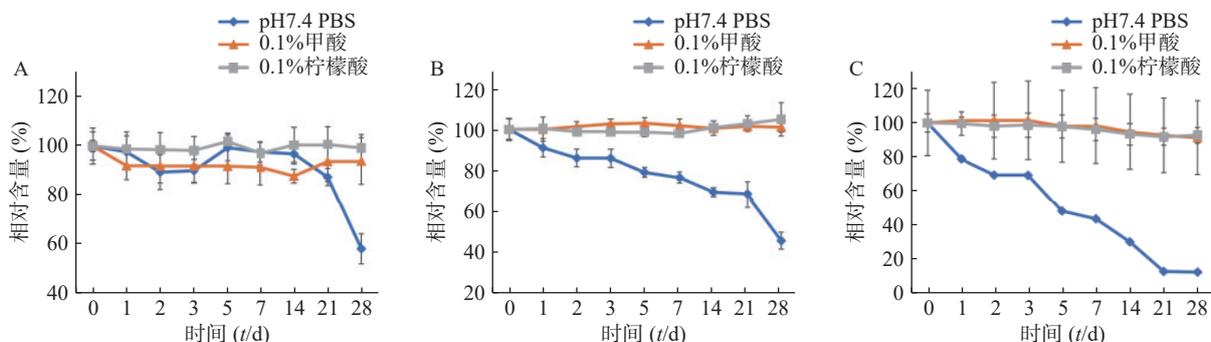


图3 TTX在不同温度、不同介质中的稳定性(A. 4℃条件下TTX浓度变化趋势;B. 25℃条件下TTX浓度变化趋势;C. 37℃条件下TTX浓度变化趋势)

- yw/20210429094401110.htm.
- [3] 关于中药配方颗粒国家标准(第二批)的公示-国家药典委员会[EB/OL].[2022-06-28]. <https://www.chp.org.cn/gjyjw/zy/16007.jhtml>.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2020: 127.
- [5] 杜航, 孙佳明, 郭晓庆, 等. 地龙的化学成分及药理作用[J]. 吉林中医药, 2014, 34(7): 707-709.
- [6] 黄帅, 徐风, 杨平, 等. 地龙的HPLC特征图谱研究[J]. 中国药房, 2015, 26(21): 2971-2974.
- [7] 孙洁, 田芳, 毛润乾, 等. 广地龙饮片的HPLC特征图谱及5个核苷类成分的测定[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(11): 2010-2019.
- [8] 关水清, 周改莲, 董婧婧, 等. HPLC同时测定广地龙中5种核苷类成分含量[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2020, 38(3): 85-91.
- [9] 吴文如, 李薇, 赖小平. HPLC法测定不同产地地龙中尿嘧啶、次黄嘌呤、尿苷、肌苷的含量[J]. 中国药师, 2011, 14(7): 914-917.
- [10] 周恒, 曹依敏, 苗水, 等. HPLC法测定沪地龙中7个核苷类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(1): 97-103.
- [11] 季倩, 高守红, 张汉明, 等. HPLC法测定各沪产地龙和广地龙中次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶和尿苷的含量[J]. 第二军医大学学报, 2015, 36(4): 443-446.
- [12] 王莎莎, 曲悦, 薛大权, 等. 地龙药材的质量标准提升研究[J]. 中国药房, 2019, 30(17): 2379-2383.
- [13] 卢绮雯, 李坚, 何琳. 高效液相色谱法测定地龙配方颗粒中次黄嘌呤的含量[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(9): 2200-2201.
- [14] 何琳, 龙晓英, 谢礼新, 等. 地龙配方颗粒的质量标准研究[J]. 中成药, 2007, 29(8): 1173-1177.
- [收稿日期] 2022-09-30 [修回日期] 2023-02-27  
[本文编辑] 崔俐俊

(上接第546页)

#### 4 讨论

TTX作为一种具有广泛应用前景的潜在镇痛药物,其在药理和作用机制方面的相关研究已有较多报道<sup>[11-13]</sup>,但对于其理化性质和成药性研究的报道极少。本研究建立了高效液相反相离子对色谱法,测定TTX在不同溶剂中的溶解性,并考察温度、溶剂pH值和氧化剂对其稳定性的影响。实验结果表明TTX在酸性条件下具有较高的溶解度,前期试验还表明TTX不溶于乙醇,二氯甲烷等有机溶剂。稳定性试验结果显示TTX在强碱溶液中较不稳定,实验条件下20 min即被强碱全部降解,而在酸性条件、氧化环境中较为稳定。不同温度稳定性试验结果同样显示,TTX在0.1%甲酸或柠檬酸溶液中4周内稳定性均良好;而在pH值=7.4 PBS中降解较为迅速,即使在4℃条件下,pH值=7.4 PBS中28 d的降解率仍然接近50%,37℃条件下28 d降解率接近90%。研究结果可为TTX处方设计及制备工艺提供实验依据,并提示研究者在开展TTX剂型研究和体外释放研究时应重点关注其稳定性和降解情况。

#### 【参考文献】

- [1] 方国锋, 王锡昌, 陶宁萍, 等. 河豚毒素的样品前处理与快速检测技术研究进展[J]. 分析测试学报, 2014, 33(12): 1447-1452.
- [2] BANE V, LEHANE M, DIKSHIT M, et al. Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection[J]. *Toxins*, 2014, 6(2): 693-755.
- [3] SAOUDI M, ABDELMOULEH A, EL FEKI A. Tetrodotoxin: a potent marine toxin[J]. *Toxin Rev*, 2010, 29(2): 60-70.
- [4] NOGUCHI T. Tetrodotoxin - distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication[J]. *Mar Drugs*, 2008, 6(2): 220-242.
- [5] 张梦倩, 储智勇, 钱晓明等. 河鲀毒素——一种具有缓解癌性疼痛潜力的药物[J]. 生物化学与生物物理进展, 2023, 50(7): 1-15.
- [6] SHI J, LIU T T, WANG X, et al. Tetrodotoxin reduces cue-induced drug craving and anxiety in abstinent heroin addicts[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2009, 92(4): 603-607.
- [7] 王兴龙, 蔡强, 桂文锋, 等. 河鲀毒素及其检测技术研究进展[J]. 水产科学, 2020, 39(3): 447-457.
- [8] KATIKOU P, GOKBULUT C, KOSKER A R, et al. An updated review of tetrodotoxin and its peculiarities[J]. *Mar Drugs*, 2022, 20(1): 47.
- [9] 张金艳, 姜雯鹏, 谭欣, 等. 基于AuPtRh纳米酶的比色适体传感器快速检测河豚毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(22): 7183-7190.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2020年版. 四部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2020, 424-425.
- [11] GOLDLUST S A, KAVOOSI M, NEZZER J, et al. Tetrodotoxin for chemotherapy-induced neuropathic pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-dose finding trial[J]. *Toxins*, 2021, 13(4): 235.
- [12] CAMPOS-RÍOS A, RUEDA-RUZAFÁ L, HERRERA-PÉREZ S, et al. Tetrodotoxin: a new strategy to treat visceral pain?[J]. *Toxins*, 2021, 13(7): 496.
- [13] BUCCIARELLI G M, LECHNER M, FONTES A, et al. From poison to promise: the evolution of tetrodotoxin and its potential as a therapeutic[J]. *Toxins*, 2021, 13(8): 517.
- [收稿日期] 2023-04-14 [修回日期] 2023-08-14  
[本文编辑] 崔俐俊