



狗皮膏大鼠长期毒性试验的体内血液铅变化研究

李帆帆, 孟宪丽, 赵贵琴, 曾勇*, 王平, 李红, 邱一行

(成都中医药大学药学院, 四川成都611137)

[摘要] **目的:**建立火焰原子吸收光谱法测定血铅方法,测定狗皮膏长期毒性试验的大鼠血铅浓度动态变化规律,为狗皮膏的安全性用药提供参考。**方法:**连续外用给予大鼠高、中、低剂量(7,3.5,1.75 g·kg⁻¹)狗皮膏90 d,于给药前、给药后10,30,45,52,60,90 d及停药后16,28 d取血,采用微波消解仪消解血液样品,用石墨炉原子吸收光谱法测量血铅含量。**结果:**经方法学考察本次试验的标准曲线回归方程 $A = 0.0049X + 0.017$, $r = 0.9995$,检测限为0.380 μg·L⁻¹,精密度检查RSD 1.4%,混合血样中血铅值175.77 μg·L⁻¹,RSD 6.0%。大鼠给予狗皮膏后,血铅浓度逐渐升高,给药中、低剂量30 d后及高剂量10 d后血铅浓度达到稳定,给药量与血铅浓度具有剂量依赖性,停药后血铅浓度降低。**结论:**本方法测定准确可靠,适合于血铅的测定,狗皮膏长期大剂量外用可引起血铅升高。

[关键词] 狗皮膏;血铅;火焰原子吸收光谱法

狗皮膏是我国的传统药物,由生川乌、独活等29味药及红丹在植物油中熬制而成,具有祛风散寒,活血止痛等功效。可用于风寒湿邪、气血瘀滞所致的痹病,或寒湿瘀滞所致的腕腹冷痛、行经腹痛、积聚痞块等。历版药典对其制法工艺及要求进行了详细的描述,但是由于在狗皮膏的熬制过程中加入了红丹(Pb₃O₄)这一物质,如果狗皮膏中的铅被人体吸收,可能会对人体的血液、神经、生殖等系统造成损害^[1]。前期研究发现本样品中铅为235.3 mg·g⁻¹^[2],并且本课题在狗皮膏的透皮吸收研究中发现其中的铅会被小鼠的皮肤所吸收^[3]。因此,有必要对狗皮膏的在体吸收进行研究,为狗皮膏的安全性用药提供参考。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠120只,体重140~160 g,雌雄各半,由四川省医学科学院提供,动物合格证号SCXK(川)2008-0024。

1.2 药品及试剂 狗皮膏由天全县中医医院提供(批号20100219);铅标准品(1 000 mg·L⁻¹,国家钢铁材料测试中心钢铁研究总院),硝酸(优级纯,成都市科龙化工试剂厂),磷酸二氢铵(优级纯,天

津市光复精细化工研究所),硝酸镁(优级纯,天津市科密欧化工试剂有限公司),肝素钠(江苏万邦生化医药有限公司,批号090310)。

1.3 仪器 WX-8000微波快速消解系统(上海屹尧微波化学技术有限公司),Z-2000原子吸收光谱仪(日立公司),ELEX3超纯水系统(Millipore corporation),SKML-1.5-4数显型电热板(北京中兴伟业仪器有限公司),XS205精密电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

2 方法

2.1 大鼠给药方法及血液样品的制备 将大鼠随机分为4组,每组30只,设为空白组、狗皮膏高、中、低剂量组(7,3.5,1.75 g·kg⁻¹),于第1次给药前24 h用8%的硫化钠脱毛4 cm×4 cm,给药期间若有毛长出则用电动脱毛机脱毛。每天给药前用电磁炉将狗皮膏加热并涂于纸上,给药面积为高剂量4 cm×4 cm、中剂量4 cm×2 cm、低剂量2 cm×1 cm,待冷却后依次贴在大鼠背部,并用纱布包缠,每天6 h,并隔1~2 h观察膏药是否仍贴于背上,若掉则重新贴上。并于给药前、给药后10,30,45,52,60,90 d及停药后16,28 d按照给药顺序依次于大鼠眼眶处取血0.7 mL,置于含肝素的试管中,-20℃冷冻保存。

2.2 血液样品处理方法 参照本课题前期方法^[3],精密量取全血0.5 mL置聚四氟乙烯消解罐中,加入硝酸5 mL,并放入微波消解仪中消解,首先在温度150℃及压力1.5×10⁶ Pa条件下消解5

[稿件编号] 20120103003

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BAI53B082)

[通信作者] *曾勇,副教授,E-mail:zengy1976@163.com

[作者简介] 李帆帆,硕士研究生,Tel:13550099597,E-mail:lff19871223@126.com



min,再以 180 °C 及 2.5×10^6 Pa 条件下消解 15 min。待消解完毕后,冷却至 50 °C,取出消解罐置电热板上浓缩至消解液约 2~3 mL,放冷,转移至 25 mL 的预先加入含 1 mL 含有 12.5% 磷酸二氢铵和 2.5% 硝酸镁混合溶液 1 mL 量瓶中,用 3% 硝酸溶液洗涤容器,洗液合并于量瓶中,并用 3% 硝酸稀释至刻度,摇匀,即得。同法做试剂空白 2 份。精密吸取对照品溶液 20 μ L,注入石墨炉原子化器中,测定吸光度。

2.3 线性关系考察 精密量取铅标准溶液(质量浓度 $1\,000\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 mL,置于 1 000 mL 量瓶中,用 2% 硝酸溶液稀释至刻度,摇匀,即为铅标准溶液储备液。分别精密量取铅标准储备液 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mL,置 50 mL 量瓶中,再分别精密加入 2 mL 含有 12.5% 磷酸二氢铵和 2.5% 硝酸镁混合溶液,然后用 2% 硝酸溶液稀释至刻度,摇匀,即得。相当于每 1 mL 溶液中分别含铅 0.0, 8.0, 16.0, 24.0, 32.0, 40.0 ng。精密吸取对照品溶液 20 μ L,注入石墨炉原子化器中,测定吸光度。

2.4 检测限 照 2.3 项下方法,制得铅元素空白溶液 11 份,测定此 11 个样品的吸光度。

2.5 精密度试验 取标准物质铅($20\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)溶液,连续进样 6 次,测定吸光度。

2.6 重复性试验 取大鼠混合血液共 6 份,按照供试品制备方法制备,测定吸光度。

2.7 加样回收率 精密量取已知含量的混合血样共 6 份,每份 0.25 mL,分别精密加入一定量的标准铅溶液,按供试品溶液的制备方法制备,依法测定,

计算回收率。

2.8 血铅测定 精密吸取对照品及样品溶液 20 μ L,注入石墨炉原子化器中,测定吸光度。

2.9 统计学处理 数据采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),方差齐者组间比较用 LSD 检验,方差不齐者用 Tamhane's T 2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 线性关系 以吸光度(A)为纵坐标,标准物质铅浓度(X)为横坐标,得回归方程 $A = 0.004\,9X + 0.017$, $r = 0.999\,5$ 。

3.2 方法检测限 求出 11 个样品的标准偏差 δ ,在置信度约 90%,取置信系数 $K = 3$,计算得铅元素的检测限为 $0.380\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.3 精密度试验 精密度试验铅的 RSD 1.4%,表明该仪器精密度良好。

3.4 重复性试验 该混合血样中血铅值 $175.772\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, RSD 6.0%,测定的方法重复性良好。

3.5 加样回收率 结果表明,本方法平均回收率为 101.7%, RSD 0.65%,该方法可靠,准确度高。

3.6 血样中铅含量测定 大鼠给予狗皮膏 10 d 后与空白组相比血液中的铅含量明显增加($P < 0.01$),停药后,血铅含量明显下降($P < 0.01$),给药 10 d 后大鼠体内血铅含量趋于稳定,并且具有剂量依赖性。同时空白组在实验第 30 天及 60~90 d 血铅有明显的升高($P < 0.01$)(表 1)。

表 1 给药后血铅的动态变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Dynamic changes of blood lead after medication($\bar{x} \pm s, n = 8$)

$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

给药时间/d	空白组	高剂量组	中剂量组	低剂量组
给药前	24.11 \pm 7.24	59.67 \pm 12.27 ¹⁾	41.11 \pm 10.52 ¹⁾	53.43 \pm 25.94 ¹⁾
给药 10	50.79 \pm 18.80	467.43 \pm 85.33 ¹⁾	317.44 \pm 67.84 ¹⁾	227.54 \pm 73.72 ¹⁾
30	69.96 \pm 10.94 ²⁾	450.21 \pm 67.98 ¹⁾	365.75 \pm 42.85 ¹⁾	353.87 \pm 57.68 ¹⁾
45	41.54 \pm 19.42	445.21 \pm 102.69 ¹⁾	398.52 \pm 31.71 ¹⁾	362.23 \pm 75.18 ¹⁾
52	62.86 \pm 31.52	448.55 \pm 101.13 ¹⁾	426.04 \pm 62.89 ¹⁾	380.24 \pm 48.23 ¹⁾
60	101.13 \pm 17.60 ²⁾	473.85 \pm 50.43 ¹⁾	434.19 \pm 83.47 ¹⁾	383.97 \pm 59.82 ¹⁾
90	89.36 \pm 26.17 ²⁾	484.98 \pm 151.22 ¹⁾	467.32 \pm 61.33 ¹⁾	428.77 \pm 62.85 ¹⁾
停药 16	38.79 \pm 29.71	274.94 \pm 36.58 ¹⁾	254.22 \pm 35.77 ¹⁾	179.86 \pm 59.64 ¹⁾
28	35.08 \pm 20.41	256.49 \pm 51.59 ¹⁾	212.09 \pm 34.59 ¹⁾	127.86 \pm 43.67 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,与空白组给药前比较²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

4.1 火焰原子吸收光谱法评价 火焰原子吸收光

谱法于 20 世纪 60 年代建立,该方法经过不断地完善,在测定重金属含量(铅、镉等)方面已逐步成熟、



稳定^[4]。同时利用微波消解的方法对血样进行处理,使得血液中的蛋白质等物质完全灰化,转变成无机盐等物质,从而让血液中的铅完全暴露出来,加入的磷酸二氢铵和硝酸镁作为基体改进剂在控制和消除背景吸收等起到了重要的作用。本实验先对其进行方法学的考察,实验证明该方法测定血中铅的含量具有良好的精密度,并且重复性良好,准确度高。

4.2 狗皮膏安全性评价 狗皮膏作为祛风止痛除痹的主要外用药,其临床应用较为广泛,本实验通过长期给药对大鼠体内铅的蓄积研究发现大鼠给予狗皮膏后发现中、低剂量在给药30 d的时候血液中铅含量已经达到了较高的水平,而高剂量在给药10 d时候已经达到了该水平,并且达到了平衡,说明狗皮膏通过皮肤给药后,其中的铅则会透过皮肤的吸收进入人体内,并具有剂量依赖性,由于铅会在体内与Ca²⁺竞争,并取代体内的Ca²⁺,因此会在骨骼等器官蓄积,并且铅能被肾排出体外^[5],因此10 d后大鼠体内铅的吸收及排泄及蓄积过程可能达到平衡。据美国疾病控制预防中心(CDC)报道,人体内的血铅安全范围应控制在100 μg·L⁻¹以内,而儿童应更低于此值,如果人体内铅含量超标,则会对人的神经系统等造成损害^[6]。但是由于大鼠和人具有

着明显的种属差异,因此狗皮膏用于人体之后是否会造成毒性反应尚未得知。对空白组的数据中发现实验过程中该组大鼠血铅含量有一定程度的增高,可能是在狗皮膏加热过程中铅随蒸汽从狗皮膏中挥发出来后被大鼠吸收所导致的,但是尚需实验进一步验证。由本实验可知,狗皮膏不可长期使用,长期使用会导致体内的铅含量增高。但是实验过程中并没有发现明显的中毒症状,具体的毒性反应应进行进一步的生化检查。

[参考文献]

- [1] 金海丽. 铅毒性的研究进展[J]. 广东微量元素科学, 2004, 11(10):9.
- [2] 马熙, 万丽, 曾勇, 等. 滴定法测定狗皮膏中铅的含量[J]. 中药与临床, 2010, 1(2):32.
- [3] 马熙. 狗皮膏中毒性成分的检测及其铅的体外透皮吸收的研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2011.
- [4] 冯兆良. 血铅的原子吸收光谱测定法[J]. 中华预防医学杂志, 1981, 15(3):183.
- [5] Cuetic D Klaassen. 毒理学[M]. 黄吉武, 周宗灿译. 北京:人民卫生出版社, 2005:721.
- [6] Marek Jakubowski. Low-level environmental lead exposure and intellectual impairment in children-the current concepts of risk assessment[J]. Int J Occup Med Environ, 2011, 24(1):1.

Study on blood lead of rats in long-term toxicity test with Goupi Gao

LI Fanfan, MENG Xianli, ZHAO Guiqing, ZENG Yong*, WANG Ping, LI Hong, QIU Yihang
 (College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To observe dynamic changes of blood lead concentration in rats with long-term toxicity test with Goupi Gao by the flame atomic absorption spectrometry, in order to provide reference for safe administration of Goupi Gao. **Method:** The rats were administered with Goupi Gao by high-dose (7 g·kg⁻¹), medium-dose (3.5 g·kg⁻¹), low-dose (1.75 g·kg⁻¹) by external use for consecutively 90 days. Then, the blood samples were collected from the rats before the administration and at 10, 30, 45, 52, 60, 90 d after the administration respectively, as well as 16 d and 28 d after the drug withdrawal. The samples were dispelled with microwave digestion system and then were determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry for blood lead levels. **Result:** According to methodological study, the standard curve regression equation in this experiment was $A = 0.0049X + 0.017$, $r = 0.9995$, with the detection limit up to 0.380 μg·L⁻¹. The RSD was 1.4% by precision checks. Blood lead level of mixed blood samples was 175.77 μg·L⁻¹, whose RSD was 6.0%. Blood lead concentration gradually increased after low-dose and medium-dose administration to rats and became stable at the 10th day and the 30th day by high-dose. Dose is directly related to blood lead concentration. Meanwhile, the blood lead concentration decreases after the drug withdrawal. **Conclusion:** The method of determination in this experiment is so accurate and reliable that it can be used for the determination of blood lead. Long-term and high-dose external use of Goupi Gao can increase blood lead.

[Key words] Goupi Gao; blood lead; flame atomic absorption spectrometry

doi:10.4268/cjmm20120607

[责任编辑 张宁宁]