

0.01); 与模型组比较, 海南青牛胆高剂量组股骨湿质量明显升高 ( $P < 0.05$ ), 高、中、低剂量组均能显著增加股骨干质量 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 作用与尼尔雌醇片相当 ( $P > 0.05$ )。

2.3 海南青牛胆对维甲酸致雄性骨质疏松大鼠股骨密度的影响: 结果见表 3。与对照组比较, 模型组大鼠股骨的骨密度显著降低, 有显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 海南青牛胆高、中、低剂量组及尼尔雌醇组大鼠的骨密度显著升高 ( $P < 0.05$ ), 呈剂量依赖关系, 且海南青牛胆高剂量组作用明显优于尼尔雌醇组 ( $P < 0.05$ )。提示海南青牛胆可对抗维甲酸所致骨密度下降的程度, 可有效防止骨量丢失。

表 3 海南青牛胆对大鼠股骨密度的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 3 Effects of *T. hainanensis* on bone mineral density of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	骨密度(像素)
对照	-	125.46 ± 16.18
模型	-	107.44 ± 7.35*
海南青牛胆	0.72	136.41 ± 11.14**
	0.36	132.95 ± 13.55**
	0.18	119.44 ± 4.78*
仙灵骨葆胶囊	0.246	111.46 ± 3.44
尼尔雌醇片	0.001	118.63 ± 7.69* <sup>△</sup>

与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>△</sup>  $P < 0.05$   
<sup>△△</sup>  $P < 0.01$ ; 与海南青牛胆高剂量组比较: <sup>△</sup>  $P < 0.05$   
 \*  $P < 0.05$  vs control group; <sup>△</sup>  $P < 0.05$  <sup>△△</sup>  $P < 0.01$  vs model group; <sup>△</sup>  $P < 0.05$  vs high dose group

### 3 讨论

海南青牛胆是海南当地黎族的常用药物, 在民间使用广泛。但是, 长期以来对其作用机制缺乏基础研究, 限制了其开发利用。本实验采用维甲酸所致的骨质疏松模型大鼠, 4 周后, 模型大鼠的骨密度降低, 血清生化指标和骨指标也显示此模型可以用于评价骨质疏松药物的药效学。

实验结果表明海南青牛胆能够明显改善维甲酸所致的大鼠骨质疏松症, 其抗骨质疏松作用较仙灵骨葆和尼尔雌醇明显; 证实了其在抑制钙流失和促进成骨细胞的形成方面的显著作用, 为进一步应用和开发提供了重要实验依据。

#### 参考文献:

- [1] 罗献瑞, 赵素云. 中国防己科资料 [J]. 广西植物, 1986 (6): 51.
- [2] 刘明生. 黎药学概论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [3] 季宇彬. 中药有效成分药理与应用 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学出版社, 1995.
- [4] 郭幼莹, 林连波, 申静. 海南青牛胆化学成分的研究 [J]. 药学报, 1998, 33(5): 350-353.
- [5] 马亚兵, 高海青, 刘新春, 等. 骨质疏松症预防与治疗的循证医学研究 [J]. 药物评价研究, 2009, 32(2): 135-139.
- [6] 许旺. 中医药治疗骨质疏松症的研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 314-315.
- [7] 海南医学院. 海南青牛胆植物总甾酮的医药用途及其制备方法 [P]. 中国专利: CN 1398589, 2002-08-03.
- [8] 姜月霞, 张俊清, 刘明生. 青牛胆急性毒性试验研究 [J]. 海南医学院学报, 2009, 15(4): 306-308.

## 马钱子碱经皮给药后在小鼠体内的药动学研究

陈军, 王立杰, 蔡宝昌\*, 胡巍, 楼成华, 王玮\*

(南京中医药大学, 江苏南京 210029)

摘要: 目的 考察马钱子碱经皮给药后在小鼠体内的药物动力学过程。方法 建立了利用 HPLC 法测定小鼠血浆中马钱子碱质量浓度的方法, 测定了 iv 4 mg/kg 马钱子碱溶液、经皮给药 40 mg/kg 马钱子碱后的血药浓度, 并对结果进行药动学拟合。结果 马钱子碱 iv 和经皮给药后的药动学均符合二室模型。经皮给药后的绝对生物利用度为 32.8%, MRT 是 iv 的 8 倍。结论 经皮给药途径可能有利于马钱子碱的减毒增效。

关键词: 马钱子碱; 药动学; 经皮给药; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2010)08-1350-03

马钱子又名番木鳖, 始载于《本草纲目》, 是马钱科植物马钱 *Strychnou nux-vomica* L. 的干燥成熟

种子, 具有通络止痛、散结消肿之功效, 马钱子碱、土的宁等吲哚类生物碱成分是其主要的有效成分。研

\* 收稿日期: 2009-10-25

基金项目: 国家科技重大新药创制专项课题(2009ZX09103-342)

作者简介: 陈军(1975-), 男, 江苏泰州人, 副教授, 药剂学博士, 主要从事中药新剂型与药物动力学研究。

Tel: (025) 85811050 E-mail: chenjun75@163.com

\* 通讯作者: 蔡宝昌 Tel: (025) 85811112 E-mail: bccai@126.com

究表明,马钱子碱在马钱子生物碱中最具有开发前景,不仅药理活性显著高于土的宁等其他生物碱<sup>[3]</sup>,而且毒性相对比较低,口服中毒剂量为土的宁的71倍,注射为45倍<sup>[4]</sup>。尽管马钱子碱的毒性远低于土的宁,但其中枢神经毒性还是成为阻碍马钱子碱临床应用的最主要障碍。采用经皮途径给药很可能在保证局部疗效的同时,显著降低马钱子碱的毒性,从而使得马钱子碱的临床应用成为可能。马钱子碱脂质体<sup>[5]</sup>、微乳<sup>[6]</sup>等经皮给药制剂初步研究已有报道。马钱子碱油水分配系数适中<sup>[7]</sup>,能够比较完全地通过小鼠皮肤<sup>[8]</sup>,经皮给药后具有确切的镇痛作用<sup>[9]</sup>。本实验在建立HPLC法测定小鼠血浆中马钱子碱质量浓度的基础上,考察了马钱子碱经皮给药后的药动学性质,以便为马钱子碱经皮给药制剂的研究开发提供依据。

## 1 材料

HP 1100 Series 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); TDL80-2B 型离心机(上海安亭科学仪器厂); XYJ-2 型高速离心机(常州国华电器公司); WH-3 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂); AG-285 电子天平(瑞典 Mettler 公司)。

马钱子碱,日本和光纯药工业株式会社,批号 059-17; 土的宁,中国药品生物制品检定所,批号 110705-200306; 乙腈,色谱纯,美国 TEDIA 公司。ICR 雄性小鼠,18~22 g,上海斯莱克实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(沪)2003-0003。

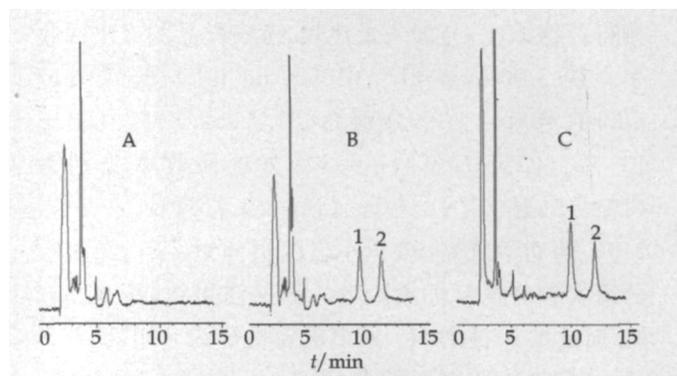
## 2 方法与结果

2.1 马钱子碱溶液的配制:由于马钱子碱在 PBS 中的溶解度不佳,因此采用含 20% 乙醇的 pH 7.4 PBS 作为溶剂,配制 5 mg/mL 马钱子碱溶液。

2.2 色谱条件:色谱柱为 Phenomenex C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相:乙腈 [0.01 mol/L 庚烷磺酸钠 0.02 mol/L 磷酸二氢钾(1:1, 用 10% 磷酸调 pH 2.8)] (24:76); 检测波长 264 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 50 μL; 柱温 30 °C。

2.3 血浆样品的处理:精密吸取血浆 0.25 mL, 加入内标(10 μg/mL 土的宁甲醇溶液) 20 μL, 加氨水 50 μL, 涡旋 30 s, 再加氯仿 2.5 mL, 涡旋 3 min, 超声 20 min, 静置 2 h, 4 000 r/min 离心 5 min, 收集下层液, 上层液再加氯仿 1 mL, 涡旋 3 min, 超声 20 min, 静置 1 h, 4 000 r/min 离心 5 min, 收集下层液, 合并两次下层液, 于 50 °C 水浴上用氮气吹干, 再用甲醇溶解并定容至 100 μL, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 即得。

2.4 专属性试验:取小鼠空白血浆、含药血浆以及给药后的血浆样品处理后进样, HPLC 色谱图见图 1。可见马钱子碱与内标土的宁的分离度良好, 血浆中内源性物质不会干扰测定。



1-马钱子碱 2-内标土的宁

1-brucine 2-strychnine (internal standard)

图 1 空白小鼠血浆(A)、500 ng/mL 马钱子碱的含药血浆(B)和经皮给药 40 mg/kg 马钱子碱溶液后 15 min 的血浆样品(C)的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC Chromatograms of blank plasma of mice (A), plasma sample with administration of 500 ng/mL brucine solution (B), plasma sample with percutaneous administration of 40 mg/kg brucine solution after 15 min (C)

2.5 标准曲线的制备:将马钱子碱溶液用空白大鼠血浆稀释得到 50、100、200、500、1 000、2 000、5 000 ng/mL, 按血浆样品的处理项下依法操作, 以血浆中马钱子碱质量浓度为横坐标, 对照品与内标峰高比为纵坐标, 用加权最小二乘法进行回归运算, 得标准曲线方程为  $Y = 0.00233X + 0.07863$ ,  $r = 0.9982$ , 线性范围 50~5 000 ng/mL。

2.6 精密度试验:精确吸取小鼠空白血浆 0.23 mL, 加入甲醇配制的系列质量浓度马钱子碱对照品溶液 20 μL, 配制成高、中、低 3 个质量浓度(5 000、500、50 ng/mL)的马钱子碱血浆样品, 按标准曲线的制备项下处理后进行分析, 各质量浓度日内重复测定 5 次, 并连续测定 5 d, 每天 1 次, 日内精密度分别为 6.26%、1.77%、3.49%, 日间精密度分别为 6.78%、3.18%、6.22%。

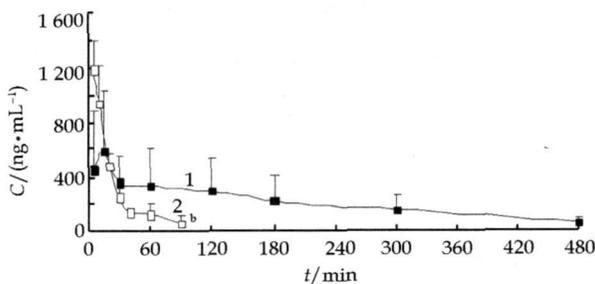
2.7 稳定性试验:取含马钱子碱 500 ng/mL 的质控血浆样品, 即时测定; 再置于 -20 °C 及室温反复冻融 1~3 次后测定, 以即时测定值为 100% 表示冻融后的实验结果。冻融 1~3 次后的质量浓度在即时测定质量浓度的 95.91%~90.45%, 表明冻融后的稳定性良好。

2.8 回收率试验:测定 5000、500、50 ng/mL 质控

血浆各 3 份,按标准曲线的制备项下处理后进行分析,其马钱子碱峰高与未经提取的相同量对照品(甲醇液)的峰高比较,得马钱子碱的绝对回收率;另将马钱子碱与土的宁峰高比带入标准曲线方法,计算测得药物浓度,与加入量比较,考察样品的方法回收率。高(5 000 ng/mL)、中(500 ng/mL)、低(50 ng/mL)的绝对回收率分别为(81.7 ± 2.8)%、(85 ± 10)%、(87 ± 7)% (n = 3);方法回收率分别为(104 ± 5)%、(101 ± 4)%、(100.2 ± 2.8)%。

2.9 药动学研究:96 只小鼠随机分为 2 组,经皮给药组实验前腹部机械脱毛。静脉注射组,按 4 mg/kg 剂量尾 iv 注射,48 只小鼠随机分为 8 组,每组 6 只,分别于给药前及给药后 5、10、20、30、40、60、90 min 各取 1 组处死并摘眼球取血放入肝素化试管中,离心、分离血浆, - 20 °C 冷冻保存。经皮给药组,按 40 mg/kg 剂量将马钱子碱溶液涂抹于已脱毛的腹部皮肤,48 只小鼠随机分为 8 组,每组 6 只,分别于给药前及给药后 5、15、30、60、120、180、300、480 min 各取 1 组处死并摘眼球取血放入肝素化试管中,离心、分离血浆, - 20 °C 冷冻保存。

静脉注射、经皮给药后的血药浓度-时间曲线见图 2。可见经皮给药后血药浓度能够迅速达到峰浓度。静脉注射后,血药浓度波动很大,消除迅速;而经皮给药后,血药浓度相对平稳,且维持时间显著延长。



1 静脉注射 4 mg · kg<sup>-1</sup> 2 经皮给药 40 mg · kg<sup>-1</sup>  
 1 4 mg · kg<sup>-1</sup> iv 2 percutaneous administration  
 of 40 mg · kg<sup>-1</sup> brucine

图 2 给药马钱子碱后小鼠的平均血浆药物浓度-时间曲线(n = 6)

Fig 2 Concentration-time curves of percutaneous administration brucine solution of mice (n = 6)

采用中国药理学学会 3P97 软件包进行房室模型拟合并计算药动学参数(统计矩法)。药动学拟合结果表明,静脉注射或两种方式经皮给药后的体内药时曲线均符合二室模型。所拟合的药动学参数见表 1。与静脉注射相比,经皮吸收途径给药能够极其显著地延长马钱子碱在体内的时间,经皮给药后,

表 1 静脉注射和经皮给药马钱子碱后的药动学参数(n = 6)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of mice after iv and percutaneous administration of brucine solution (n = 6)

参数	单位	静脉注射	经皮给药
AUC <sub>0-∞</sub>	μg · h · L <sup>-1</sup>	553.00	1 912.00
AUC <sub>0-t</sub>	μg · h · L <sup>-1</sup>	508.00	1 669.00
MRT	h	0.49	3.93
CL/F	L · kg <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup>	7.23	2.09
V <sub>ss</sub> /F	L · kg <sup>-1</sup>	3.56	8.22
Ke	h <sup>-1</sup>	1.30	0.26
C <sub>max</sub>	μg · L <sup>-1</sup>	—	594.00
t <sub>max</sub>	h <sup>-1</sup>	—	0.25

MRT 为静脉注射的 8 倍。经皮给药后的绝对生物利用度为 32.8%。

2.10 经皮给药后药物残留量的测定:取 6 只小鼠,经皮给予 40 mg/kg 马钱子碱溶液 8 h(即药物动力学研究维持时间)后,处死,用生理盐水将给药部位冲洗 5 次,合并冲洗液,定容后微孔滤膜滤过,取续滤液,按以上操作,HPLC 法测定马钱子碱质量浓度并计算残留量。测得经皮给药 8 h 后给药部位的药物残留量占给药剂量的(24 ± 8)% (n = 6)。

### 3 讨论

马钱子碱具有较强的中枢神经毒性,小鼠 iv 的 LD<sub>50</sub> 仅为 12 mg/kg<sup>[10]</sup>,因此静脉 iv 对照组采用了 4 mg/kg 的剂量,在此剂量下未发现有小鼠死亡。

经皮途径给药可能是避免马钱子碱毒性反应的有效手段。马钱子碱同时具有中枢和外周镇痛作用<sup>[3]</sup>,经皮给药途径虽然在降低中枢神经毒性的同时可能降低了其中枢镇痛作用,但对外周镇痛作用(如麻痺神经末梢)影响可能不大。本课题组所做的药理学研究也表明:马钱子碱经皮给药仍具有显著的镇痛活性<sup>[9]</sup>,采用马钱子碱溶液进行的评价未发现其经皮给药存在皮肤刺激性。

马钱子碱的油水分分配系数比较适中,37 °C 下 lgP 为 0.70<sup>[7]</sup>,体外透皮实验结果表明,马钱子碱能够比较完全地通过小鼠皮肤<sup>[8]</sup>,但本实验测得的在体经皮吸收的绝对生物利用度仅为 32.8%。皮肤残留量的测定结果表明,实验结束后残留的药物仅占给药剂量的约 1/4,即约有 75% 的药物能够进入皮肤,但绝对生物利用度仅为 32.8%,是否是由于存在经皮吸收过程中的代谢或皮肤内蓄积,还有待于进一步的研究。

### 参考文献:

[1] Deng X K, Yin W, Li W D, et al. The anti-tumor effects of alkaloids from the seeds of strychnos nux vomica on HepG2

平行试验6份, RSD为3.106%, 表明重现性良好。

2.7 仪器精密性: 取同一样品溶液, 连续测定6次, RSD为1.863%, 表明仪器精密性良好。

2.8 加样回收试验: 取同一样品5份, 精密加入1000 μg/mL 镉标准液0.25 μL, 按2.3项操作。平均回收率为98.25%, RSD为4.886%。

2.9 样品测定: 按2.3项平行操作制备供试液。按“2.4”项条件测定。结果见表3。因第6、7组在养殖过程中全部死亡, 不计富集系数。

表3 样品镉离子量测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Determination of cadmium in sample ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	躯干/(mg·kg <sup>-1</sup> )	内脏/(mg·kg <sup>-1</sup> )	全蚓/(mg·kg <sup>-1</sup> )
1	1.05±0.12	10.06±2.40	2.95±0.05
2	16.51±0.46	36.32±2.39	20.37±2.08
3	19.54±0.41	56.89±3.96	25.38±0.52
4	48.77±4.58	90.15±0.23	71.73±4.12
5	82.17±4.68	143.03±7.04	101.79±1.48
6	46.39±4.01	74.23±8.18	49.81±4.12
7	27.36±0.71	52.37±0.46	27.76±0.52

实验过程中密切观察各组参环毛蚓的活动状态, 按时随机取样检测其全蚓、躯干和内脏所含镉离子的浓度, 并将其与各组土壤浓度进行比较分析。结果表明, 1~4组的参环毛蚓在整个14 d养殖过程中均生长良好, 体质量保持不变或略有增加。此时, 蚓体内脏和全蚓的镉离子最高浓度分别为90、70 mg/kg。随着养殖时间的推移, 高镉浓度污染的第6组和7组从第5天和第6天开始出现异常情况, 表现为参环毛蚓活力下降, 体形变小, 体质量减轻, 或呈结节状, 出现缢缩痕, 有的尾部脱落, 直到第7天两组蚯蚓均全部死亡。在养殖至第11天和第14天时, 第5组的参环毛蚓体形也发生变小或呈结节状, 并分别有1条蚯蚓死亡。

### 3 讨论

本研究发现, 中低浓度镉污染组中的参环毛蚓

均能正常存活, 而且在此环境中蚓体内脏和全蚓的镉离子浓度随土壤镉离子浓度递增而增加, 最高可达90、70 mg/kg, 该浓度是中国对外贸易经济合作部发布的《药用植物及制剂进出口绿色行业标准》中所规定的中药材重金属镉离子限量的233~300倍。由此可见, 参环毛蚓对重金属镉离子具有极强的耐受能力, 这很可能是广地龙药材重金属超标的重要原因之一。

实验中还发现生长良好的参环毛蚓(1~4组)镉离子量内脏均高于躯干, 内脏镉量是躯干的1.8~9.8倍, 此结果表明, 参环毛蚓主要是通过消化系统吸收镉离子, 此结果与Stuërzenbaum等<sup>[3]</sup>研究粉正蚓 *Lumbricus rubellus* 对镉的蓄积结果一致。

此外, 将参环毛蚓投入高浓度(24 mg/kg以上)镉土壤中它会迅速死亡, 而当投入到较低浓度镉土壤中时, 参环毛蚓会适应此环境而正常存活, 其内脏和全蚓浓度可分别高达90、70 mg/kg以上, 该浓度远远超过24 mg/kg。此结果提示参环毛蚓在不超出生理极限的情况下, 机体会产生某种有效的重金属解毒机制, 而表现出机体对镉离子的高耐受性。

总之, 上述实验结果为进一步研究参环毛蚓重金属富集机制提供了必要的依据, 同时, 对于今后解除参环毛蚓重金属富集作用的策略制定以及提高广地龙药材品质优良度也具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] 冯耀南, 刘明, 刘俭, 等. 中药材商品规格质量鉴别[M]. 广州: 暨南大学出版社, 1995
- [2] 喻良文, 裴建社, 李薇, 等. 参环毛蚓对土壤含水量及pH值因子的选择研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(6): 1310-1311
- [3] Stuërzenbaum S R, Kille P, Morgan A J. The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein [J]. *FEBS Lett*, 1998, 431(3): 437-442
- [4] 皮性能和兔皮肤刺激性研究[J]. 中国医药工业, 2006, 37(3): 172-174
- [5] 徐丽君, 魏世超, 陆付耳, 等. 马钱子若干组分治疗实验性关节炎的比较研究[J]. 同济医科大学学报, 2001, 30(6): 564-565
- [6] 宋金春, 王玉广. 马钱子碱微乳的制备及其体外透皮吸收的研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(12): 928-931
- [7] 陈军, 胡巍, 蔡宝昌, 等. 马钱子碱体外经皮吸收性质考察[J]. 中药材, 2008, 31(3): 445-447
- [8] 胡巍, 陈军, 蔡宝昌. 马钱子碱与土的宁体外经皮渗透性质的考察[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(12): 1053-1056
- [9] 胡巍, 陈军, 蔡宝昌, 等. 马钱子碱经皮给药的镇痛作用[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(2): 385-386
- [10] Malone M H, St J A, Katherine M, et al. Brucine lethality in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 1992, 35(3): 295-297

(上接第1352页)

- [1] cells and its possible mechanism [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 106: 179-186
- [2] Yin W, Wang T S, Yin F Z, et al. Analgesic and anti-inflammatory properties of brucine and brucine N-oxide extracted from seeds of *Strychnos nux-vomica* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 88: 205-214
- [3] 林明侠, 张浩, 徐涛. 马钱子的毒理学研究[J]. 中医药信息, 2002, 19(1): 25-26
- [4] 张路, 简江波, 盛燕, 等. 马钱子碱脂质体的大鼠离体透