

马钱子生物碱类成分经皮给药后在小鼠体内的药动学研究

王 绚^{1,2,3,4,5}, 陈 军^{1,2}, 屈艳格^{1,2,3,4,5}, 蔡宝昌^{2,3,4,5*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046

2. 江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210029

3. 南京中医药大学 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 江苏 南京 210029

4. 国家中医药管理局中药炮制标准重点研究实验室, 江苏 南京 210029

5. 南京海昌中药集团, 江苏 南京 210061

摘要:目的 考察马钱子碱、马钱子总生物碱和优化马钱子总生物碱凝胶剂经皮给药后在小鼠体内的药动学过程。方法 建立测定小鼠血浆中马钱子碱质量浓度的 HPLC 法, 比较含相同剂量 (10.8 mg/kg) 马钱子碱各凝胶剂经皮给药后, 马钱子碱的血药浓度, 并对结果进行药动学拟合。结果 经皮给药后马钱子生物碱类成分的药动学行为均符合二室模型。优化马钱子总生物碱凝胶剂能显著增加马钱子碱的体内吸收, 相对生物利用度显著提高, AUC_{0-t} 是马钱子碱凝胶剂的 1.74 倍, 是马钱子总生物碱凝胶剂的 1.89 倍, 其他药动学参数无显著差异。结论 以优化马钱子总生物碱经皮给药, 可有效改善单体马钱子碱和总生物碱的体内药动学行为, 有利于对马钱子碱的减毒增效。

关键词: 马钱子; 马钱子碱; 优化马钱子总生物碱; 马钱子总生物碱; 药动学; 经皮给药

中图分类号: R282.710.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)12-2484-05

In vivo pharmacokinetics of total alkaloids from seeds of *Strychnos nux-vomica* after transdermal administration to mice

WANG Xuan^{1,2,3,4,5}, CHEN Jun^{1,2}, QU Yan-ge^{1,2,3,4,5}, CAI Bao-chang^{2,3,4,5}

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing 210029, China

3. Engineering Center for Standardization of Chinese Medicine Processing, Ministry of Education, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

4. Key laboratory for Standardization of Chinese Medicine Processing, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

5. Nanjing Haichang Chinese Medicine Group Corporation, Nanjing 210061, China

Abstract: Objective: To evaluate the *in vivo* pharmacokinetics of hydrogels of brucine, total alkaloids, and optimal total alkaloids from the seed of *Strychnos nux-vomica* by transdermal administration to mice. **Methods** A sensitive and specific HPLC method was established to determine the concentration of brucine in mice plasma, and the pharmacokinetics of alkaloids from the seed of *S. nux-vomica* was compared at the same dose of brucine (10.8 mg/kg) and their results were fitted by pharmacokinetics. **Results** Pharmacokinetic parameters showed that brucine behaved as a two-compartment model in three hydrogels after transdermal administration. The hydrogels of optimal total alkaloids had better absorption in contrast with brucine and the total alkaloids, and its relative bioavailability was remarkably increased. Compared with brucine and the total alkaloids from *S. nux-vomica*, the AUC_{0-t} of the optimal total alkaloids from *S. nux-vomica* was 1.74 and 1.89 times, respectively. **Conclusion** The optimal total alkaloids could show greater superiority than the total alkaloids and improve the pure brucine on the *in vivo* pharmacokinetic properties after transdermal administration, which indicates that a transdermal formulation of the optimal total alkaloids from *S. nux-vomica* could be a promising candidate aimed at reducing toxicity and enhancing its therapeutic efficacy.

Key words: seeds of *Strychnos nux-vomica* L.; brucine; optimal total alkaloids; total alkaloids; pharmacokinetics; transdermal administration

收稿日期: 2011-07-01

基金项目: 国家科技部“十一五”重大新药创制专项项目 (2009ZX09103-342)

作者简介: 王 绚 (1988—), 女, 硕士, 研究方向为中药新剂型与药物动力学。E-mail: xuan_jeanne@163.com

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

马钱子又名番木鳖,始载于《本草纲目》,是马钱科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子,具有通络止痛、散结消肿之功效,在中医临床上应用广泛。马钱子中的有效部位是总生物碱,其含生物碱成分至少有16种^[1],主要成分是马钱子碱和土的宁。马钱子碱具有很强的镇痛、抗炎、免疫调节等药理活性^[2-5],临床上常用于镇咳、祛痰、抑菌和抗肿瘤。土的宁是马钱子总生物碱中毒性最强的成分,是造成总生物碱剧毒的主要物质基础。马钱子碱口服给药中毒剂量为土的宁的71倍,注射给药为45倍,安全范围较大^[6],而土的宁在镇痛、抗炎、免疫调节等方面的药理活性均不突出^[7],甚至不如其他马钱子生物碱类成分。故若除去马钱子总生物碱中的大部分土的宁,则可大大降低马钱子总生物碱的毒性,同时又保留了其药理活性,提高了其临床用药的安全性,克服因强烈的中枢神经毒性而限制马钱子总生物碱临床应用与制剂开发这一最大障碍。经皮给药在保证局部疗效的同时,可显著降低马钱子的毒性。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,以凝胶剂为载体,研究马钱子碱、马钱子总生物碱和优化马钱子总生物碱凝胶剂局部外用给药后小鼠的体内吸收特征,考察含相同剂量马钱子碱的不同凝胶剂中不同马钱子生物碱类成分的药动学行为,为优化马钱子总生物碱经皮给药制剂的研发提供依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

马钱子购于浙江中医药大学中药饮片厂,批号20090219,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为马钱科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子;马钱子碱对照品(批号110706-200505)、石杉碱甲(批号100243-200401)均购自中国药品生物制品检定所;乙腈,色谱纯,美国 TEDIA 公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

LC—2010A 高效液相色谱仪(日本岛津公司),TGL—16B 型离心机(上海安亭科学仪器厂),AG—285 电子天平(瑞典 Mettler 公司),PHS—3C pH 计(上海康仪仪器有限公司),WH—3 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂),KQ—500E 型超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.3 动物

ICR 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)2007-0005。

2 方法与结果

2.1 马钱子总生物碱的提取与精制

生马钱子打粉(过50目筛)后,称取50 g,以15倍量的70%乙醇回流提取3次,每次0.5 h,滤过,合并3次滤液,以旋转蒸发仪真空浓缩至干,用1 mol/L 盐酸100 mL 超声溶解,4 000 r/min 离心10 min,取上清液,用40%氢氧化钠调 pH 值至12,用二氯甲烷萃取3次,合并二氯甲烷萃取液,真空干燥,精密称定质量,马钱子总生物碱的得率为 $(3.11 \pm 0.33)\%$ ($n=5$)。采用酸性染料比色法^[8]测得马钱子总生物碱的质量分数为 $(98.50 \pm 0.38)\%$ ($n=3$)。

2.2 马钱子总生物碱的优化

称取“2.1”项制得的马钱子总生物碱粉末100 mg,超声溶解于50%乙醇50 mL 中(通过比较马钱子碱和土的宁在50%、70%、95%乙醇中24 h 的溶解度,可知这2个成分在50%乙醇中溶解度相差最大),置真空干燥箱中浓缩至原体积的8%,可见烧瓶壁上有大量白色结晶析出,倒出浓缩液,壁上沉淀用甲醇溶解,真空干燥,精密称定质量。浓缩液4 000 r/min 离心10 min,倒出上清液,置4℃冰箱静置过夜,4 000 r/min 离心10 min,弃去沉淀,上清液置真空干燥箱干燥,精密称定质量,得到优化马钱子总生物碱。经 HPLC 法测定,优化前马钱子碱和土的宁分别占马钱子总生物碱的23.43%、41.27%,优化后分别占51.90%、18.14%(马钱子碱与土的宁的质量比为2.86:1),马钱子碱的相对比例大大提高,而土的宁除去了很大部分。

2.3 马钱子生物碱凝胶剂的制备

取一定量的卡伯姆-940 粉末(约1 g),缓慢加入约8 g 甘油中,用玻棒持续搅拌,然后将一定量的蒸馏水逐滴加至上述溶液中,加至100 mL,搅拌均匀,至少溶胀48 h,直至完全膨胀、透明;再加入三乙醇胺,轻轻搅拌避免空气混入。该水凝胶基质的 pH 值控制在6.4~7.0^[9]。

精密称取24 mg 优化马钱子总生物碱、马钱子总生物碱和马钱子碱,溶解于0.5 mL 聚乙二醇-400(PEG-400)中,加入5 g 水凝胶基质,再加入0.15 g(3%)氮酮,超声溶解,密封保存。

2.4 小鼠血浆中马钱子碱的 HPLC 法测定

2.4.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为 pH 2.8 酸水(含0.01 mol/L

庚烷磺酸钠与 0.02 mol/L 磷酸二氢钾等量混合溶液, 10%磷酸调节 pH 值至 2.8) -乙腈 (76:24), 体积流量 1 mL/min, 检测波长 264 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μ L。

2.4.2 血浆样品处理 精密吸取小鼠血浆 100 μ L 置 10 mL 尖底离心管中, 加内标 (40 μ g/mL 石杉碱甲甲醇溶液) 20 μ L、氨水 100 μ L, 涡旋 30 s; 再加氯仿 2.5 mL, 涡旋 3 min, 超声 20 min, 静置 1 h, 4 000 r/min 离心 10 min, 收集下层液, 上层血浆再加氯仿 2 mL, 重复上次操作, 合并两次下层液, 于 50 °C 水浴上用氮气吹干, 用 100 μ L 流动相复溶, 12 000 r/min 高速离心, 吸取上清液, 即得。

2.4.3 对照品溶液制备 精密称取一定量的马钱子碱, 用甲醇配制成 100 μ g/mL 的母液, 分别取不同体积的母液进行稀释, 定容至 10 mL 量瓶内, 配成质量浓度分别为 0.5、3、20 μ g/mL 的对照品溶液。

2.4.4 内标溶液制备 精密称取石杉碱甲 10 mg, 甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 得质量浓度为 1 mg/mL 母液, 再吸取 0.5 mL, 用甲醇定容至 10 mL, 配成 40 μ g/mL 的内标溶液。

2.4.5 专属性试验 取小鼠空白血浆、血浆+对照品以及给药后血浆样品处理后进样。可见马钱子碱、士的宁与内标石杉碱甲的分离度良好, HPLC 图见图 1。血浆中内源性物质不干扰测定^[10]。

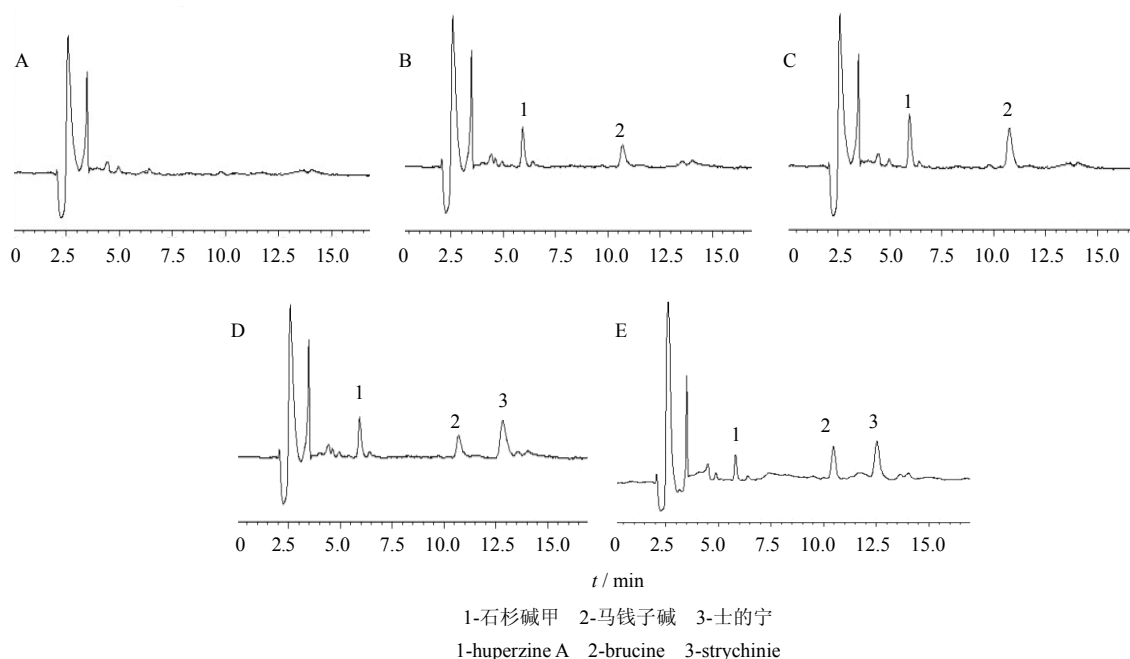


图1 空白血浆 (A)、空白血浆+对照品 (B)、马钱子碱凝胶剂血浆样品 (C)、马钱子总生物碱凝胶剂血浆样品 (D)、优化马钱子总生物碱凝胶剂血浆样品 (E) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatogram of blank plasma (A), blank plasma + reference substance (B), plasma sample spiked with brucine hydrogel (C), plasma sample spiked with total alkaloids hydrogel (D), and plasma sample spiked with optimal total alkaloids hydrogel (E)

2.4.6 标准曲线绘制 分别精密吸取不同体积的 0.5、3、20 μ g/mL 马钱子碱对照品溶液于具塞离心管中, 以空白小鼠血浆稀释得到 50、100、180、300、600、1 200、2 000 ng/mL 的马钱子碱溶液。按“2.4.2”项下方法处理后进行分析。以对照品峰高与内标峰高比值 (Y) 对血浆中马钱子碱质量浓度 (X) 用加权 ($1/C^2$) 最小二乘法进行回归运算, 得标准曲线方程为 $Y=0.003\ 256\ X+0.033\ 391$, $r=0.994\ 3$, 线性范围 50~2 000 ng/mL。

2.4.7 精密度试验 取马钱子碱高、中、低 3 个质量浓度 (2 000、300、50 ng/mL) 的质控血浆样品, 按“2.4.2”项下方法处理后进行分析, 各质量浓度样品于 1 d 内重复测定 5 次, 计算日内精密度; 连续测定 5 d, 每天 1 次, 计算日间精密度。结果马钱子 2 000、300、50 ng/mL 3 个质量浓度血浆样品的日内精密度分别为 4.35%、2.06%、3.49%, 日间精密度分别为 3.82%、1.19%、6.22%。

2.4.8 回收率试验 取 2 000、300、50 ng/mL 质控

血浆各 3 份,按“2.4.2”项下方法处理后进行分析,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;另将马钱子碱与内标石杉碱甲峰高比带入标准曲线,计算得药物质量浓度,与加入量比较,考察样品的方法回收率。结果 2 000、300、50 ng/mL 质控血浆马钱子碱的绝对回收率分别为 $(95.70 \pm 1.03) \%$ 、 $(93.78 \pm 2.18) \%$ 、 $(91.80 \pm 5.24) \%$;方法回收率分别为 $(101.45 \pm 2.00) \%$ 、 $(103.87 \pm 2.95) \%$ 、 $(96.84 \pm 1.76) \%$ 。

2.4.9 稳定性试验 取质量浓度为 300 ng/mL 的质控血浆样品,即时测定;再置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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。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%内,表明冻融后的样品稳定性良好。

2.4.10 药动学研究 144 只小鼠随机分为马钱子碱凝胶剂组、优化马钱子总生物碱凝胶剂组、马钱子总生物碱凝胶剂组,每个凝胶剂再随机分成 8 组,每组 6 只,雌雄各半。实验前 24 h 腹部脱毛,3 种凝胶剂的给药剂量为 10.8 mg/kg (按有效成分马钱子碱计),分别于给药前及给药后 10、20、40、60、90、120、180、240 min 自眼眶取血,置肝素化试管中,4 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存。3 种马钱子生物碱凝胶剂经皮给药后马钱子碱的血药浓度-时间曲线见图 2。

所得小鼠血药浓度数据用 DAS 2.0 药动学程序软件进行房室模型拟合,并采用统计矩法计算药动

学参数。药动学拟合结果显示,马钱子生物碱类 3 种凝胶剂的体内过程均符合二室模型,药动学参数见表 1。含相同剂量马钱子碱的凝胶剂经皮给药后,优化马钱子总生物碱凝胶剂中的马钱子碱吸收最强,其 $\text{AUC}_{0 \rightarrow t}$ 是马钱子碱凝胶剂的 1.74 倍,是马钱子总生物碱凝胶剂的 1.89 倍,而 $C_{\max}$ 是马钱子碱凝胶剂的 2.09 倍,是马钱子总生物碱凝胶剂的 2.42 倍。

表 1 3 种马钱子生物碱凝胶剂在小鼠体内的主要药动学参数

Table 1 Pharmacokinetic parameters of three hydrogels of alkaloids from seed of *S. nux-vomica* after transdermal administration to mice

参数	单位	马钱子碱凝胶剂	优化马钱子总生物碱凝胶剂	马钱子总生物碱凝胶剂
$\text{AUC}_{0 \rightarrow t}$	$\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$	58 332.85	101 727.5	53 669.45
$\text{AUC}_{0 \rightarrow \infty}$	$\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$	69 845.38	109 836.5	59 421.56
$\text{MRT}_{0 \rightarrow t}$	min	88.967	86.986	88.745
$\text{MRT}_{0 \rightarrow \infty}$	min	133.94	104.246	112.224
$t_{1/2}$	min	84.416	55.976	63.268
$t_{\max}$	min	40	60	40
Vz/F	$\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	18.836	7.942	16.593
CLz/F	$\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.155	0.098	0.182
$C_{\max}$	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	447.14	935.15	385.61

3 讨论

马钱子碱同时具有中枢神经系统作用和外周镇痛作用^[11],虽然经皮给药途径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(如麻痹神经末梢)影响可能不大^[12]。因此经皮途径给药可能是避免马钱子碱不良反应的较为有效手段。

优化马钱子总生物碱能显著提高马钱子碱的体内吸收,相对生物利用度大大提高,其他药动学参数无显著改变。因此以优化马钱子总生物碱给药,可以有效改善单体马钱子碱和马钱子总生物碱的体内药动学行为,减毒增效,这是否与去除大部分土的宁后,马钱子中其他生物碱的比例相对提高有关,还有待进一步研究。本实验采用 HPLC 法检测马钱子碱血药质量浓度,方法专属性好、灵敏度高;采用有机溶剂二次萃取的方法进行血浆样品处理,回收率达 90%以上。马钱子生物碱类成分经皮给药途径的药动学研究为优化马钱子总生物碱这一有效部位外用制剂的开发提供了依据。

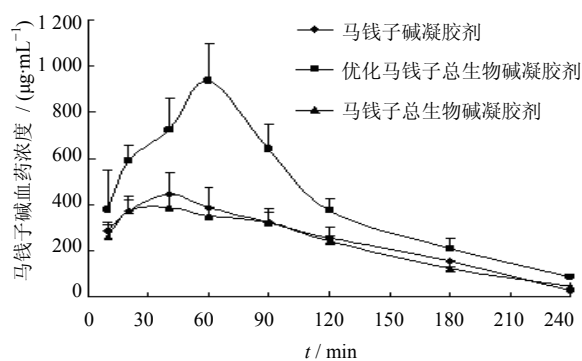


图 2 3 种马钱子生物碱凝胶剂经皮给药后马钱子碱血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Concentration-time profiles of brucine in three hydrogels of alkaloids from seed of *S. nux-vomica* after transdermal administration to mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参考文献

- [1] 蔡宝昌, 吴 皓, 杨秀伟, 等. 马钱子中 16 个生物碱类化合物 ^{13}C -NMR 谱的数据分析 [J]. 药学学报, 1994, 29(1): 44-48.
- [2] 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 cells and its possible mechanism [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 106(2): 179-186.
- [3] 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.
- [4] 徐 睿, 吕晓宇, 蔡宝昌, 等. 马钱子碱对人肝癌细胞 HepG2 细胞膜电位和通透性的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(11): 1692-1696.
- [5] 邓旭坤, 蔡宝昌, 吕晓宇, 等. 马钱子碱及其脂质体对移植性荷瘤小鼠抗肿瘤作用的对比研究 [J]. 中草药, 2006, 37(3): 389-393.
- [6] 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.
- [7] 魏世超, 徐丽君, 张秀桥, 等. 马钱子总生物碱对大鼠佐剂性关节炎的作用 [J]. 中国药理学通报, 2001, 17(4): 479-480.
- [8] 陈 军, 蔡宝昌, 沈春云, 等. 马钱子总生物碱的含量测定 [J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(6): 468-471.
- [9] Wang J L, Yuan Y, Liu C S, *et al.* Preparation and pharmaceutical/pharmacodynamic evaluation of topical brucine-loaded liposomal hydrogel [J]. *J Mater Sci*, 2009, 20(10): 2075-2084.
- [10] 肖寒露, 陈 军, 蔡宝昌, 等. HPLC 同时测定大鼠血浆中马钱子碱和土的宁的浓度 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11): 26-29.
- [11] 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(2/3): 205-214.
- [12] 陈 军, 王立杰, 蔡宝昌. 马钱子碱经皮给药后在小鼠体内的药动学研究 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1350-1352.

《现代药物与临床》杂志征稿与征订启事

《现代药物与临床》杂志 (CN12-1407/R, ISSN 1674-5515) 是国家级医药科技期刊, 天津市一级期刊, 2009 年 1 月由《国外医药·植物药分册》更名为《现代药物与临床》, 并被美国《化学文摘》(CA)、波兰《哥白尼索引》(IC)、美国《乌里希期刊指南》(Ulrich's Periodicals Directory), 美国《剑桥科学文摘》(CSA)、英国《全球健康》(Global Health)、CNKI 中国期刊全文数据库、中国核心期刊 (遴选) 数据库等刊载。为了进一步提高期刊质量, 2010 年出版的《现代药物与临床》全新改版, 更加突出创新性 with 实用性, 紧跟国内外药学发展趋势, 适时追踪热点, 从栏目内容、文章质量, 到封面版式、装帧印刷都得到了全面的提升与改进。

办刊宗旨: 报道国内外药物研究的新进展与新技术, 以及药物在临床应用方面的最新动态, 为新药研发、生产人员以及临床医生与药剂师合理用药提供有益的参考。

内容与栏目: 涵盖药物的基础研究与临床研究各学科, 设置“专论与综述”、“实验研究”、“临床研究”、“未来药物”、“药事管理”、“知识产权”、“药物经济学”和“市场信息”等栏目。“专论与综述”栏目除报道植物药研究的最新进展外, 诚征有关药物与临床研究前沿的前瞻性文章。

读者对象: 药物研发、生产、监管人员, 以及临床医生与药剂师。

《现代药物与临床》双月刊, 国内外公开发刊, 封面铜板彩色覆膜。为扩大信息量、缩短出版周期, 本刊由 64 页扩版为 80 页; 为惠顾广大读者, 改版不提价, 每期定价仍为 15 元, 全年 90 元。本刊自办发行, 请直接与编辑部联系订阅。

本刊网上在线投稿、审稿、查询系统正式开通, 欢迎投稿、欢迎订阅!

《现代药物与临床》编辑部

地址: 天津市南开区鞍山西道 308 号 (300193)

电话与传真: (022) 23006823

网址: www.中草药杂志社.中国; www.tiprpress.com

邮箱: dc@tiprpress.com

开户银行: 兴业银行天津南开支行

账号: 44114010010081504

户名: 天津中草药杂志社