

马钱子总碱囊泡凝胶经皮给药后在大鼠组织中的分布研究

李静雅^{1,2}, 苗凤茹³, 朱丹², 林力^{1*}, 林成仁¹, 刘建勋^{1*}

1. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091

2. 中央民族大学中国少数民族传统医学研究院, 北京 100081

3. 航天中心医院 神经内科, 北京 100049

摘要: 目的 研究马钱子总碱囊泡凝胶经皮给药后在大鼠组织中的分布。方法 18只SD大鼠经皮给予马钱子总碱囊泡凝胶后0.5、2、6h, 采集大鼠皮肤、骨骼肌、脑、心、肺、肝、脾、肾、胃、小肠、脂肪、睾丸、子宫、关节等组织, 以溶剂萃取法对样品进行提取, 应用LC-MS/MS联用技术对各组织中的马钱子碱和土的宁进行测定。结果 经皮给药后, 马钱子碱和土的宁在大鼠体内分布较广, 主要分布在肺、肝、肾、小肠, 其次为心脏、关节、皮肤等, 而在脑、肌肉、脂肪中的分布量较低。结论 马钱子总碱囊泡凝胶能减少马钱子碱和土的宁在脑、心脏的分布, 有利于降低中枢毒性和心脏毒性。

关键词: 马钱子; 囊泡; 马钱子碱; 土的宁; 组织分布; LC-MS/MS

中图分类号: R283.6; R969.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)02-0327-05

Tissue distribution of total alkaloids in *Strychni Semen* vesicle gel in rats after transdermal administration

LI Jing-ya^{1,2}, MIAO Feng-ru³, ZHU Dan², LIN Li¹, LIN Cheng-ren¹, LIU Jian-xun¹

1. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China

2. China Minority Traditional Medical Center, Minzu University of China, Beijing 100081, China

3. Department of Neurology, Aerospace Central Hospital, Beijing 100049, China

Abstract: Objective To study the tissue distribution of total alkaloids in *Strychni Semen* vesicle gel after transdermal administration in rats. **Methods** Total alkaloids in *Strychni Semen* vesicle gel was applied to 18 SD rats of SPF grade. Tissues of skin, skeletal muscle, brain, heart, lung, liver, spleen, kidney, stomach, intestine, fat, testicle, uterus, and joint were collected at 0.5, 2, and 6 h after transdermal administration. Samples were extracted by ethyl acetate-*n*-butanol (7 : 3) and brucine and strychnine in each tissue were determined by LC-MS/MS method. **Results** The two ingredients were mainly distributed in lung, liver, kidney, and intestine, followed with heart, joint, and skin, while low in brain, muscle, and fat. **Conclusion** Total alkaloids in *Strychni Semen* vesicle gel could reduce the distribution of brucine and strychnine in brain and heart, which is benefit to lower the toxicity of the two ingredients in central nervous system and cardiovascular system.

Key Word: *Strychni Semen*; vesicle; brucine; strychnine; tissue distribution; LC-MS/MS

马钱子碱 (brucine) 和土的宁 (strychnine) 是马钱子中的主要药效成分, 具有镇痛、抗炎的药理作用, 临床上用于治疗类风湿性关节炎, 疗效确切, 但这两种成分也是马钱子中的主要毒性成分, 对中枢神经系统和心血管系统等均有毒性^[1]。以马钱子为主药的经皮给药系统能够发挥马钱子局部活络、止痛、散结的功效, 同时克服了口服毒性大的缺点,

而非离子型表面活性剂囊泡 (non-ionic surfactant-based vesicles) 具有缓释、靶向性的优势, 能够促进药物的透皮吸收并增强药物分布的靶向性, 从而发挥减毒增效的作用, 因此将其应用于马钱子经皮给药制剂具有一定的意义。

近年来, 关于马钱子的动力学特征已有相关研究^[2-3], 但关于其组织分布的研究较为少见。有研究

收稿日期: 2011-06-09

基金项目: “十一五”重大新药创制项目“候选药物研究”(2009ZX09103-395)

作者简介: 李静雅 (1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药复方药理学。Tel: (010)62835041 E-mail: rinomasayoshi@126.com

*通讯作者 林力 Tel: (010)62835618

刘建勋 Tel/Fax: (010)62874049 E-mail: liujx0324@sina.com

显示,马钱子碱和土的宁能够透过血脑屏障^[4-5],且在体内分布较广泛,而在心、脑、肝、肾中的量较高。本实验应用 LC-MS/MS 联用技术,对马钱子总碱囊泡凝胶经皮给药后在大鼠组织中的分布进行研究,从而对马钱子总碱囊泡凝胶在体内的靶向修饰作用以及药动学特性进行评价。

1 材料

1.1 药品与试剂

马钱子总碱囊泡凝胶,含药量 2 mg/g,北京宝德润生医药科技发展有限公司,批号 20101112;土的宁对照品(批号 110705-200306)、马钱子碱对照品(批号 110706-200505),中国药品生物制品检定所;他克林(Tacrine)对照品,批号 A79922,质量分数 $\geq 99\%$,Sigma-Aldrich 公司。乙腈、甲醇,色谱纯,美国 Fisher 公司;甲酸,色谱纯,J. T. Baker 公司;甲酸铵,色谱纯,Mreda Technology 公司;其他试剂为市售分析纯。

1.2 仪器

API 4000 Q—TRAP 型三重四极杆串联质谱仪,配有离子喷雾离子源以及 Analysis 1.5 数据处理系统,美国 Applied Biosystem 公司;Agilent 1200 高效液相色谱输液泵,自动进样器,美国 Agilent 公司;MDF—U333 Biomedical Freezer 超低温冰箱,日本 Sanyo 公司;M18780 氮吹仪,美国 Pierce 公司;MS1 Minishaker 涡旋混合器,德国 IKA Labortechnik 公司;Mikro 22R 台式高速冷冻离心机,德国 Hettich 公司;T25B 匀浆机,德国 IKA Labortechnik 公司;TP—213 电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司。

1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,体质量(200 \pm 10)g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2006-0009,合格证号 0201616。

2 方法与结果

2.1 LC-MS/MS 条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent ZORBAX XDB-C₁₈ 柱(50 mm \times 2.1 mm, 5 μ m),流动相 A 为 0.05% 甲酸水溶液(含 10 nmol/L 甲酸铵),流动相 B 为乙腈-甲醇(1:1,含 0.05% 的甲酸,10 nmol/L 甲酸铵)。梯度洗脱程序:0~0.5 min, 11% B; 0.5~1.5 min, 11%~67% B; 1.5~2.0 min, 67% B; 2.0~6.5 min, 11% B。体积流量 0.32 mL/min,柱温 30 $^{\circ}$ C。

2.1.2 质谱条件 离子喷射电压 5 000 V,源内气体

GS1(N₂)为 344 kPa,源内气体 GS2(N₂)为 207 kPa,气帘气体 70 kPa,碰撞气 Medium,源内温度 550 $^{\circ}$ C。检测方式,正离子检测;扫描方式,多反应监测方式。用于定量分析的离子对:土的宁 m/z : 335.2 \rightarrow 184.2,马钱子碱 m/z : 395.2 \rightarrow 324.2,他克林 m/z : 199.1 \rightarrow 171.1。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取马钱子碱、土的宁和他克林对照品适量,以甲醇配制成 1 000 μ g/mL 对照品溶液,并逐级稀释 10 倍至 10 μ g/mL。

2.3 内标溶液的制备

精密吸取上述 10 μ g/mL 他克林储液,以超纯水配成 2 ng/mL 内标溶液。

2.4 分组与给药

大鼠随机分为 3 组,每组 6 只,雌雄各半,实验前 12 h 禁食不禁水。实验前 12 h 除去大鼠背部和腹部皮肤(4 cm \times 4 cm),在背部脱毛区均匀涂抹马钱子总碱囊泡凝胶剂 12.5 mg/kg(凝胶质量 6.25 g/kg),给药区表面用聚乙烯覆盖并以医用胶布固定,2 h 后去除凝胶并以纯净水洗净给药部位皮肤。

2.5 组织样品采集与预处理

于给药后 0.5、2.0、6.0 h 各处死 1 组大鼠,迅速取大鼠非给药处(腹部)皮肤、骨骼肌、脑、心、肺、肝、脾、肾、胃、脂肪、睾丸、子宫、小肠、关节,用生理盐水洗去残留血液,滤纸吸干,精密称取 0.3 g,加入 3 倍量生理盐水匀浆,于-30 $^{\circ}$ C 保存至检测。取组织匀浆 100 μ L,加入 2 ng/mL 的他克林溶液(内标)和氨水各 50 μ L,涡旋 30 s 混匀,加入醋酸乙酯-正丁醇(7:3)混合溶剂 1 000 μ L,涡旋震荡 30 s 后,于 20 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 10 min,取 800 μ L 上清液,40 $^{\circ}$ C 水浴下氮气吹干,加入 100 μ L 流动相[A-B(7:3)]复溶,涡旋震荡 30 s,20 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液待测。

2.6 方法学考察

2.6.1 专属性试验 分别取大鼠空白组织匀浆,以空白组织匀浆配制马钱子碱和土的宁混对照品溶液,按“2.5”项下方法处理大鼠给药后采集的组织样本,并进行测定。结果表明,组织样品处理方法以及测定条件具有专属性,样本中的内源性物质不干扰测定。

2.6.2 线性关系考察 分别精密吸取含 10 μ g/mL 马钱子碱、土的宁的标准溶液各 100、25 μ L,以超纯水配制含马钱子碱 1 μ g/mL、土的宁 0.25 μ g/mL

的混合标准溶液，用倍量稀释法配制标准系列溶液。取大鼠空白组织匀浆 50 μL，精密加入 50 μL 标准系列溶液，每个质量浓度 5 份样品，按“2.5”方法操作，建立标准曲线。以待测物质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，加权最小二乘法 (权重 1/X²) 进行回归运算。马钱子碱和土的宁的

回归方程以及线性范围结果见表 1 和 2。

2.6.3 提取回收率试验 在标准系列溶液中选择低、中、高 3 个质量浓度，以空白组织匀浆配制成 3 个质量浓度的质控样品，每个质量浓度 5 份样品，按“2.5”项下方法处理样品，同时以流动相配制相同质量浓度的对照样品。以测得的质控样品与相应

表 1 大鼠各组织中马钱子碱的线性回归方程和线性范围 (n=5)

Tabal 1 Regression equations and linear range of brucine in each tissue of rats (n=5)

组 织	回归方程	r	线性范围 / (ng·mL ⁻¹)
脑	$Y = 0.462\ 0\ X + 0.003\ 80$	0.995 7	0.097 7~25.000 0
心脏	$Y = 0.087\ 1\ X + 0.006\ 30$	0.997 7	0.195 0~25.000 0
肺	$Y = 0.045\ 5\ X + 0.003\ 41$	0.993 2	0.097 7~25.000 0
肠	$Y = 0.104\ 0\ X + 0.052\ 50$	0.991 1	0.195 0~25.000 0
胃	$Y = 0.065\ 8\ X + 0.000\ 80$	0.992 3	0.097 7~25.000 0
肝	$Y = 0.033\ 5\ X + 0.001\ 87$	0.994 8	0.097 7~25.000 0
脾	$Y = 0.048\ 8\ X + 0.003\ 52$	0.992 9	0.195 0~25.000 0
脂肪	$Y = 0.073\ 5\ X - 0.002\ 20$	0.996 9	0.097 7~25.000 0
肌肉	$Y = 0.050\ 6\ X + 0.000\ 04$	0.994 7	0.097 7~25.000 0
肾	$Y = 0.074\ 6\ X + 0.002\ 42$	0.995 8	0.097 7~12.500 0
关节	$Y = 0.034\ 6\ X + 0.001\ 32$	0.992 7	0.097 7~25.000 0
睾丸	$Y = 0.064\ 3\ X - 0.001\ 58$	0.993 6	0.097 7~25.000 0
皮肤	$Y = 0.032\ 9\ X + 0.000\ 78$	0.992 3	0.097 7~25.000 0
子宫	$Y = 0.028\ 9\ X + 0.001\ 22$	0.994 8	0.097 7~25.000 0

表 2 大鼠各组织中土的宁的线性回归方程和线性范围 (n=5)

Tabal 2 Regression equations and linear range of strychnine in each tissue of rats (n=5)

组 织	回归方程	r	线性范围 / (ng·mL ⁻¹)
脑	$Y = 0.335\ X + 0.013\ 30$	0.996 3	0.024 4~6.250 0
心脏	$Y = 0.333\ X + 0.021\ 90$	0.995 4	0.048 8~6.250 0
肺	$Y = 0.344\ X + 0.023\ 40$	0.996 1	0.024 4~6.250 0
肠	$Y = 0.410\ X + 0.031\ 10$	0.997 1	0.048 8~6.250 0
胃	$Y = 0.319\ X + 0.009\ 45$	0.995 6	0.024 4~6.250 0
肝	$Y = 0.290\ X + 0.008\ 66$	0.994 9	0.024 4~6.250 0
脾	$Y = 0.172\ X + 0.010\ 10$	0.993 5	0.048 8~6.250 0
脂肪	$Y = 0.264\ X + 0.003\ 18$	0.992 1	0.024 4~6.250 0
肌肉	$Y = 0.320\ X + 0.006\ 55$	0.996 3	0.024 4~6.250 0
肾	$Y = 0.303\ X + 0.007\ 00$	0.994 5	0.024 4~3.130 0
关节	$Y = 0.322\ X + 0.008\ 50$	0.996 7	0.024 4~6.250 0
睾丸	$Y = 0.185\ X + 0.008\ 57$	0.995 8	0.024 4~6.250 0
皮肤	$Y = 0.104\ X + 0.004\ 79$	0.993 1	0.024 4~6.250 0
子宫	$Y = 0.089\ X + 0.002\ 84$	0.995 8	0.024 4~6.250 0

质量浓度的对照样品的峰面积, 计算其绝对回收率。结果表明, 该提取方法对各组织中两种成分的提取回收率为 75%~130%, RSD 小于 14%。

2.6.4 基质效应考察 取不同大鼠空白组织匀浆 100 μL , 按“2.5”项下方法提取, 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下氮气吹干后以 200 μL 流动相复溶, 将标准样品储液直接氮气吹干, 以上述基质提取后复溶液 100 μL 加入标准样品中, 即提取后添加样品 (M), 每个质量浓度制备 3 份样品。同时按照“2.6.3”项下方法制备对应质量浓度的对照样品。以添加样品和对照样品的峰面积计算基质效应 (ME)。结果各组织的 ME 均在 88%~112%, 表明不存在明显的基质效应。

2.6.5 精密度试验和准确度试验 以大鼠空白组织匀浆配制成 3 个浓度的质控样品, 按“2.5”项下方法操作, 每个质量浓度 5 份样品, 考察方法的日内

精密度 (RSD) 和准确度。结果显示, 14 个脏器的 3 个质量浓度的马钱子碱 RSD 为 0.75%~13.8%, 准确度为 88%~114%; 士的宁 RSD 为 0.89%~16.4%, 准确度为 87%~110%, 表明该方法符合相关要求。

2.7 组织样品测定

经皮给予马钱子总碱囊泡凝胶后, 马钱子碱和士的宁在大鼠全身分布较广, 且随时间呈动态变化。给药后 0.5 h, 马钱子碱在肺、小肠、肾的量较高, 而在脾、子宫、肌肉、心和脑的量低于 20 ng/g ; 士的宁在肺、小肠的量较高, 在皮肤、肌肉、胃、心、脑和脂肪中的量较低。给药后 2 h, 马钱子碱和士的宁在大鼠组织的量有所降低。给药后 6 h, 马钱子碱在胃、肠中的量最高, 大于 200 ng/g , 而士的宁在胃、子宫、小肠等组织中的量较高。结果见图 1。

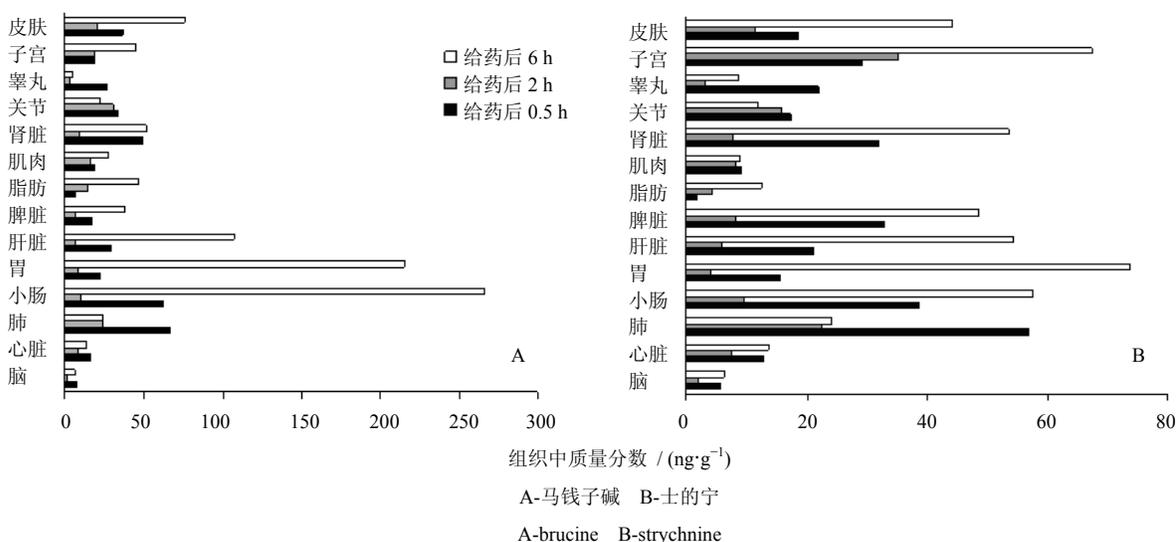


图 1 经皮给药后各时间点马钱子碱 (A) 和士的宁 (B) 在大鼠组织中的分布 (n=6)

Fig. 1 Distribution of brucine (A) and strychnine (B) in each tissue of rats at various time points after transdermal administration (n=6)

3 讨论

目前, 关于马钱子生物碱组织分布的研究不多, 蔡宝昌等^[5]考察给大鼠 iv 马钱子总生物碱提取物后, 药物在多个脏器组织的分布情况, 认为马钱子生物碱能在 0.5~1 h 内迅速分布于各组织并达峰值, 在脑、脾、肺和肾脏中都有较高的分布, 其次为心脏、肝和肌肉等。与之相比较, 经皮给药后马钱子生物碱进入体内的量极低且分布缓慢, 这主要与经皮局部给药的特点有关; 此外与静脉给药不同, 囊泡制剂给药后脑组织中的量明显低于其他组织。

本实验结果显示, 囊泡凝胶经皮给药后 0.5 h, 马钱子碱主要分布于大鼠的肺、小肠、肾、皮肤、肝等组织; 给药后 2 h, 主要分布在关节、肺、皮肤等组织中; 除去药物后 4 h, 马钱子碱在胃、小肠中的量升高, 其次分布于肝、皮肤、肾等组织中的量较高。给药后 0.5 h, 士的宁主要分布于肺、小肠、脾、肾等; 给药后 2 h, 在子宫、肺、关节等分布较多; 除去药物后 4 h, 士的宁主要分布在胃、子宫、小肠, 其次为肝、肾和脾等组织。这些结果表明, 马钱子总碱囊泡凝胶给药后马钱子碱和士的宁在组

组织中分布很广, 主要分布于肝、肾、肺、小肠, 其次为心脏、关节, 虽能透过血脑屏障, 但在脑组织中的浓度低于 10 ng/g。

马钱子的毒性是限制马钱子临床应用的主要障碍。马钱子碱和土的宁能够通过血脑屏障, 在心脏和脑组织中的量较高, 可能是其产生中枢毒性的原因之一^[4-6]。本实验结果表明, 囊泡凝胶经皮给药后在组织中分布广泛, 但量较低, 说明经皮给药能够降低其体内水平, 囊泡包封下的马钱子生物碱在肝脏和胃肠的分布较高, 但心脏和脑内的量较低, 其原因可能与囊泡结构的天然靶向性有关。非离子型囊泡能够改变药物分子的粒子体积和油水分配系数, 从而改变药物在不同组织中的亲和性^[7-8]。经过囊泡修饰后, 进入体内的药物在脑组织的分布低于其他组织, 提示囊泡制剂具有一定的靶向修饰作用, 能够降低药物的脑内和心肌内浓度, 从而有助于减弱马钱子碱和土的宁的中枢毒性和心脏毒性。

致谢: 北京宝德润生医药科技发展有限公司对样品制备和课题设计所提供的帮助。

参考文献

- [1] 贾旋旋, 李文, 李俊松, 等. 马钱子的毒性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(18): 2396-2399.
- [2] 陈军, 王立杰, 蔡宝昌, 等. 马钱子碱经皮给药后在小鼠体内的药代动力学研究 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1350-1352.
- [3] 赵继会, 刘召林, 孙占国, 等. 马钱子碱聚乳酸纳米粒在家兔体内的药代动力学研究 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1422-1425.
- [4] 许妍妍. 基于配伍理论的痹祺胶囊药代动力学研究 [D]. 天津: 天津大学, 2010.
- [5] 蔡宝昌, 徐晓月, 潘扬, 等. 马钱子生物碱在大鼠体内的组织分布 [J]. 中国药理学通报, 2004, 20(4): 421-424.
- [6] 李晓天, 陈西敬, 王广基. 口服马钱子碱后小鼠体内的药代动力学研究 [J]. 中国药理学杂志, 2004, 39(6): 52-54.
- [7] Koga K, Ohyashiki T, Murakami M, *et al.* Modification of ceftibuten transport by the addition of non-ionic surfactants [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 49(1): 17-25.
- [8] Khatib M A, Farr S J, Taylor G, *et al.* The *in vitro* characterisation and biodistribution of some non-ionic surfactant coated liposomes in the rabbit [J]. *J Drug Target*, 1995, 3(1): 39-49.