

马钱子生物碱类成分经口给药后在大鼠体内的药动学研究

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

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 比较马钱子生物碱类成分(马钱子碱、马钱子总生物碱和马钱子优化总生物碱)ig给药后在大鼠体内的药动学过程。方法 大鼠ig给药后取血,以石杉碱甲为内标,HPLC法测定大鼠血浆样品中马钱子碱,DAS 1.0程序拟合房室模型并计算药动学参数。结果 马钱子生物碱类成分ig给药后马钱子碱的药动学行为均符合二室模型;与马钱子碱单体给药相比,马钱子总生物碱与马钱子优化总生物碱能显著增加马钱子碱的体内吸收,其他药动学参数无显著差异。结论 ig给以马钱子生物碱类成分后,马钱子其他生物碱类成分对马钱子碱有吸收促进作用。

关键词: 马钱子; 马钱子碱; 马钱子总生物碱; 马钱子优化总生物碱; 药动学

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)08-1008-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.08.017

In vivo pharmacokinetics of strychnos alkaloids in rats after ig administration

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

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 strychnos alkaloids [brucine, total alkaloids in *Strychni Semen* (TASS), and optimal total alkaloids in *Strychni Semen* (OTASS)] by ig administration to rats. **Methods** The rats were ig administered with strychnos alkaloids and their blood samples were taken. Huperzine A was used as an internal standard. The brucine in plasma of rats was detected by HPLC method. The compartment model was fitted and the pharmacokinetic parameters were calculated by DAS1.0 program. **Results** The pharmacokinetic analysis showed that brucine behaved as a two-compartment model in the three solutions after ig administration in rats. Compared with brucine monomer administration, the solution of TASS and OTASS could obviously increase the absorption of brucine *in vivo*, but other pharmacokinetic parameters had no significant difference. **Conclusion** After ig administration with strychnos alkaloids, the other alkaloids in *Strychni Semen* could promote the absorption of brucine.

Key words: *Strychni Semen*; brucine; total alkaloids in *Strychni Semen*; optimal total alkaloids in *Strychni Semen*; pharmacokinetics

马钱子又名番木鳖,是马钱科植物马钱子 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子,具有通络止痛、散结消肿之功效。马钱子的有效部位是总生

物碱,至少含16种生物碱成分^[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、抗肿瘤等药理作用^[2-6],临床上常用于镇咳、祛痰、

收稿日期: 2012-07-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30701111)

作者简介: 屈艳格,在读硕士,研究方向为中药新剂型与药物动力学。Tel: (025)86798281 E-mail: ztquyangegg@126.com

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

抑菌和抗肿瘤。土的宁约占总生物碱量的50%，但药理作用（如镇痛抗炎）相对较弱，是马钱子的主要毒性成分^[7]。土的宁、马钱子碱 ig 给予小鼠后的 LD₅₀ 分别为 3.27、233 mg/kg，ip 给药后的 LD₅₀ 分别为 1.53、69 mg/kg^[8]。因此除去马钱子总生物碱中的部分土的宁，既可降低总生物碱的毒性，又能基本保留其原有的药理作用，提高临床用药的安全性^[9]。前期研究表明，与马钱子总生物碱和马钱子碱相比，从马钱子总生物碱中去除大部分土的宁得到的马钱子优化总生物碱，其镇痛、抗炎、免疫、抗肿瘤等药理作用显著增强，且毒性显著下降^[10]。本实验在建立 HPLC 法测定大鼠血浆中马钱子碱的基础上，研究马钱子碱、马钱子总生物碱（total alkaloids in *Strychni Semen*, TASS）和马钱子优化总生物碱（optimal total alkaloids in *Strychni Semen*, OTASS）ig 给药后在大鼠体内吸收特征和药动学差异，为马钱子优化总生物碱口服制剂的研发提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

马钱子，浙江中医药大学中药饮片厂，经南京中医药大学蔡宝昌教授鉴定为马钱科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子。对照品马钱子碱（批号 110706-200505）、石杉碱甲（批号 100243-200401），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

岛津 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

SD 大鼠，体质量 180~220 g，雌雄各半，南京医科大学动物房提供，合格证号：SCXK（苏）2008-0004。

2 方法与结果

2.1 马钱子总生物碱的提取^[11]

称取过 50 目筛的马钱子粉末 200 g，以 15 倍量 70%乙醇回流提取 3 次，每次 0.5 h，滤过，合并 3 次滤液，于旋转蒸发器浓缩至干，1 mol/L 盐酸 400 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 12.0，二氯甲烷萃取，

合并萃取液，真空干燥除去二氯甲烷，精密称定质量，得马钱子总生物碱，得率为 2.65%。

2.2 马钱子优化总生物碱的制备^[11]

称取马钱子总生物碱粉末 100 mg 置烧杯中，50%乙醇 50 mL 中超声溶解，置真空干燥箱中浓缩至原体积的 0.08 倍，烧杯壁及底部有大量白色结晶析出。取浓缩液，4 000 r/min 离心 10 min，取上清液，至 4 °C 冰箱中静置过夜，再取上清液，4 000 r/min 离心 10 min，弃去沉淀，75 °C 真空干燥，即得马钱子优化总生物碱，得率为 31.09%。经 HPLC 法测定，在优化前马钱子碱和土的宁分别占马钱子总生物碱的 20.56%、42.35%，在优化后分别占 34.90%、16.14%（马钱子碱与土的宁的质量比为 2.1:1），表明优化后去除了马钱子总生物碱中的大部分土的宁。

2.3 马钱子碱测定

2.3.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为 pH 2.8 酸水（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，用 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 50 μL。

2.3.2 血浆样品的采集与处理 SD 大鼠 4 只，禁食不禁水 12 h 以上，其中 1 只眼眶取血，置肝素化试管中，4 000 r/min 离心 10 min，吸取上清液，-20 °C 冰箱冷冻保存，得大鼠空白血浆。取大鼠空白血浆，加入 1.05 mg/mL 的马钱子碱对照品 20 μL，得到含对照品血浆样品。另外 3 只大鼠分别 ig 给予马钱子碱、马钱子总生物碱和马钱子优化总生物碱（剂量以马钱子碱计 1 mg/kg）1 mL/100 g，60 min 后眼眶取血，置肝素化试管中，4 000 r/min 离心 10 min，吸取上清液，-20 °C 冰箱冷冻保存，得给药后血浆样品。

取给药后血浆样品 100 μL，加石杉碱甲内标液 20 μL、5 倍量 0.04 mol/L 碳酸钠溶液，涡旋 30 s，加正己烷-二氯甲烷-异丙醇（体积比为 65:35:5）4 mL，涡旋 3 min，4 000 r/min 离心 10 min，取上清液，于 50 °C 水浴上氮气吹干，100 μL 甲醇复溶，12 000 r/min 高速离心，吸取上清液，即得。

2.3.3 对照品溶液制备 精密称取一定量的马钱子碱，甲醇定容至 10 mL 量瓶中，配制成 1.05 mg/mL 的对照品储备液，4 °C 冰箱备用。

2.3.4 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, 配制成 1 mg/mL 溶液, 再用甲醇稀释至 40 $\mu\text{g/mL}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2.3.5 方法学考察

(1) 专属性试验: 取大鼠空白血浆、空白血浆+

对照品及给药后血浆样品, 按“2.3.2”项方法处理后进样。可见内标石杉碱甲与马钱子碱、士的宁的分离度良好, 血浆中内源性物质不干扰测定^[12]。HPLC 图见图 1。

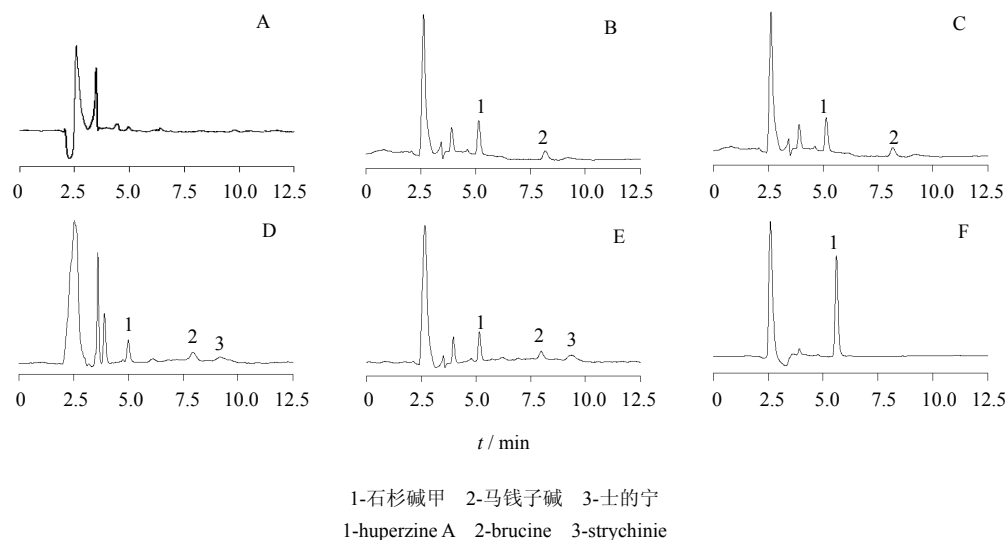


图 1 空白血浆 (A)、空白血浆+对照品 (B)、马钱子碱给药血浆样品 (C)、马钱子总生物碱给药血浆样品 (D)、马钱子优化总生物碱给药血浆样品 (E)、石杉碱甲 (F) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank plasma (A), blank plasma + reference substance (B), plasma sample spiked with brucine (C), plasma sample spiked with TASS (D), and plasma sample spiked with OTASS (E), and reference huperzine A (F)

(2) 标准曲线绘制: 精密吸取马钱子碱储备液于具塞离心管中, 以大鼠空白血浆稀释得到 50、180、300、600、1 200、2 000 ng/mL 的马钱子碱溶液。按“2.3.2”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 ($1/C^2$) 最小二乘法进行线性回归, 得标准曲线方程为 $Y=0.021\ 815+0.000\ 899\ X$, $r=0.997\ 2$, 线性范围 50~2 000 ng/mL。

(3) 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“2.3.2”项下方法处理后进行分析, 各样品于日内重复测定 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。结果马钱子碱质量浓度为 2 000、300、50 ng/mL 的血浆样品的日内精密度 RSD 分别为 3.56%、2.18%、4.13%, 日间精密度 RSD 分别为 3.56%、1.43%、6.21%。

(4) 回收率试验: 将马钱子碱溶液用大鼠空白血浆分别稀释至 2 000、300、50 ng/mL, 按“2.3.2”项下方法处理后进行分析, 其马钱子碱峰高与等量对照品甲醇溶液的峰高比较, 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 质控血浆中马钱子碱的绝对回收率分别为 (91.70 $\pm$ 2.09) %、(93.78 $\pm$ 3.12) %、(91.12 $\pm$ 3.24) %; 方法回收率分别为 (92.45 $\pm$ 1.20) %、(94.87 $\pm$ 3.12) %、(97.66 $\pm$ 0.89) %。

(5) 稳定性试验: 将马钱子碱溶液用大鼠空白血浆分别稀释至 2 000、300、50 ng/mL, 即时测定, 以即时测定值为 100%; 再置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 及室温反复冻融 1~3 次后测定。结果冻融 1~3 次后, 2 000、300、50 ng/mL 血浆样品中马钱子碱的量为即时测定值的 91.36%~92.95%, 表明冻融后的样品稳定性良好。

2.4 药动学研究

将 18 只大鼠随机分为马钱子碱组、优化马钱子总生物碱组、马钱子总生物碱组, 每组 6 只, 雌雄各半, 给药前禁食过夜。3 种试药溶液给药剂量均为 1 mg/kg (按有效成分马钱子碱计), 分别于给药后 5、10、15、30、60、90、120、180、240、360、480 min 自眼眶取血 0.7 mL, 置肝素化试管中, 4 000

r/min 离心 10 min, 吸取上清液, -20 ℃冰箱冷冻保存, 检测。

所得大鼠血药浓度数据采用 DAS 1.0 药动学程

序软件进行房室模型拟合, 结果显示 3 种试药溶液的体内过程均符合二室模型。采用统计矩法计算药动学参数, 见表 1。血药浓度-时间曲线见图 2。

表 1 3 种马钱子生物碱溶液在大鼠体内的药动学参数

Table 1 Pharmacokinetic parameters of three solutions of strychnos alkaloids after ig administration in rats

参 数	单 位	马钱子碱	马钱子总生物碱	马钱子优化总生物碱
$AUC_{0 \rightarrow t}$	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$	855.060 ± 67.830	$1\,050.680 \pm 98.230$	$1\,276.160 \pm 104.130$
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$	924.380 ± 83.960	$1\,173.890 \pm 104.320$	$1\,338.350 \pm 115.230$
$MRT_{0 \rightarrow t}$	min	89.010 ± 9.2320	83.522 ± 7.213	75.668 ± 11.872
$MRT_{0 \rightarrow \infty}$	min	113.260 ± 11.210	90.480 ± 9.270	96.390 ± 13.290
$t_{1/2}$	min	213.610 ± 10.780	209.170 ± 15.320	186.222 ± 11.210
$t_{\max}$	min	10	15	15
V_z/F	$\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	8.773 ± 0.912	6.872 ± 1.014	6.145 ± 0.781
CL/F	$\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.016 ± 0.001	0.013 ± 0.002	0.013 ± 0.001
$C_{\max}$	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	510.270 ± 35.280	518.470 ± 41.320	551.780 ± 39.180

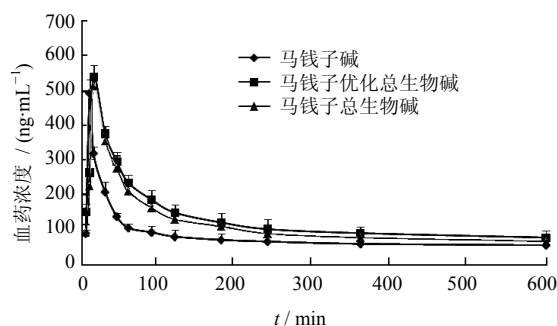


图 2 3 种马钱子生物碱溶液 ig 给药后马钱子碱药时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Concentration-time profiles of brucine in three solutions of strychnos alkaloids after ig administration in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 讨论

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; 采用混合有机溶剂 1 次萃取的方法进行血浆样品处理, 马钱子碱绝对回收率达 90% 以上。

由药动学参数可见, 给予马钱子优化总生物碱后, 其中的马钱子碱吸收增强, 其 $AUC_{0 \rightarrow t}$ 是马钱子碱给药的 1.49 倍; 给予马钱子总生物碱后, 其中的马钱子碱吸收也增强, 其 $AUC_{0 \rightarrow t}$ 是马钱子碱给药的 1.27 倍, 生物利用度也明显提高。因此以马钱子总生物碱类给药, 可以有效改善马钱子碱单体的体内药动学行为, 马钱子优化总生物碱给药后, 其中的马钱子碱的生物利用度也有所提高。

本研究结果提示, 土的宁促进马钱子碱的 ig 吸收并存在最优比例, 当土的宁比例超过一定值时促马钱子吸收作用下降。前期研究也表明, 土的宁促进马钱子碱的体外透皮吸收, 马钱子碱与土的宁混合溶液中马钱子碱的体外经皮渗透速率比单用马钱子碱显著提高了近 1.5 倍, 土的宁对马钱子碱的促吸收作用可能是由于两者之间产生相互缔合, 提高了马钱子碱的脂溶性^[13]。但当土的宁的比例超过一定值时, 由于两者的结构相近, 且均为 P 糖蛋白的底物, 因此可能存在相互竞争性抑制, 从而不利于吸收^[14]。这一假说虽然有文献报道, 但仍需要进一步的实验验证。

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): 44-47.
- [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): 179-184.
- [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): 564-569.
- [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] 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): 479-484.
- [7] 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): 25-29.
- [8] 黄韶清, 周玉淑, 刘仁树. 现代急性中毒诊疗学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2002.
- [9] 蔡宝昌, 陈 军, 陈志鹏. 一种提取纯化马钱子总生物碱的方法及其在制药中的应用: 中国, CN 101804096 A [P]. 2010-8-18.
- [10] Chen J, Wang X, Qu Y G, *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activity and pharmacokinetics of alkaloids from seeds of *Strychnos nux-vomica* after transdermal administration: effect of changes in alkaloid composition [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(1): 181-188.
- [11] 高 颖. 优化马钱子、总生物碱的制备及药效学研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2010.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Xu D H, Yan M, Li H D. Influence of P-glycoprotein on brucine transport at the *in vitro* blood-brain barrier [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 690(1/3): 68-76.