

马钱子碱在大鼠体内的组织分布研究

瞿叶清¹, 祁艳², 钱丽萍¹, 陈军², 林爱华³, 蔡宝昌² (1. 南京大学医学院附属鼓楼医院动物实验中心, 江苏 南京 210008; 2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210029; 3. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510120)

摘要: **目的** 考察马钱子碱的体内分布特征。**方法** 建立 HPLC 法测定大鼠体内组织和血浆中马钱子碱浓度的方法。大鼠静脉注射马钱子碱 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 测定不同时间点(5, 20, 60, 120, 180 min)马钱子碱在组织和血浆中的浓度。**结果** 马钱子碱在肾组织中分布最多(22 %), 其次是脾(18 %)、小肠(16 %), 在性腺中亦有一定分布(11 %), 在脑中的分布最少(1 %)。**结论** 马钱子碱具有很高的组织亲和性, 而且在不同组织中的分布差异较大, 肾组织浓度最高, 提示肾脏很可能是其主要的排泄途径; 脾组织浓度也较高, 可能与马钱子碱具有免疫调节作用有关; 在性腺中亦有一定分布。

关键词: 马钱子碱; 组织分布; 高效液相色谱法

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)03-0307-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.017

Tissue Distribution of Brucine in Rats

QU Yeqing¹, QI Yan², QIAN Liping¹, CHEN Jun², LIN Aihua³, CAI Baochang² (1. Center of Animal Laboratory, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008 Jiangsu, China; 2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029 Jiangsu, China; 3. The Second Clinical Medical College, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the tissue distribution properties of brucine. **Methods** To determine the concentrations of brucine in the tissues and plasma, the HPLC method was validated. Following intravenous injection, brucine concentrations in different tissues and plasma were measured at time points of 5, 20, 60, 120 and 180 min, respectively. **Results** The highest AUC(area under the curve)was obtained in the kidney(22 %). And high distribution was also found in the spleen(18 %), small intestine(16 %) and gonad(11 %). The lowest AUC of brucine was found in the brain(1 %). **Conclusion** Brucine possesses high tissue affinity, and its concentrations vary significantly among different tissues. The highest distribution of brucine in the kidney suggests that urine excretion might be its main elimination route. And the high distribution in the spleen might be associated with its immunomodulatory efficacy. More attention should be paid to the potential toxicity of reproductive system due to its high AUC.

Keywords: Brucine; Tissue distribution; HPLC

马钱子碱是中药马钱子的主要活性成分, 其含量约占马钱子有效部位总生物碱的 20 %, 具有镇痛、抗炎、抗肿瘤作用^[1], 同时也是治疗类风湿性关节炎

的有效药物^[2]。马钱子碱的药理活性很强, 但具有一定的中枢神经毒性, 因此开展马钱子碱的体内药动学研究对于安全合理用药具有重要意义。作者前期

收稿日期: 2013-10-25

作者简介: 瞿叶清, 女, 硕士, 研究方向: 动物模型的构建与药理学研究。Email: quyeqing1980@163.com。通讯作者: 陈军, 副教授, 博士。研究方向: 中药新剂型与药物动力学。Email: chenjun75@163.com; 蔡宝昌, 教授, 博士生导师。研究方向: 中药新药的研究与开发。Email: bccai@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30701111, 81001644); 广东省自然科学基金项目(10451040701004643)。

已经对马钱子碱的血浆药动力学进行了系统研究^[3-5], 结果表明马钱子碱的体内表观分布容积较高, 提示其具有较好的组织亲和性, 给药后能够迅速向组织内分布。本研究进一步考察了马钱子碱静脉注射后在大鼠体内的组织分布特性。

1 实验材料

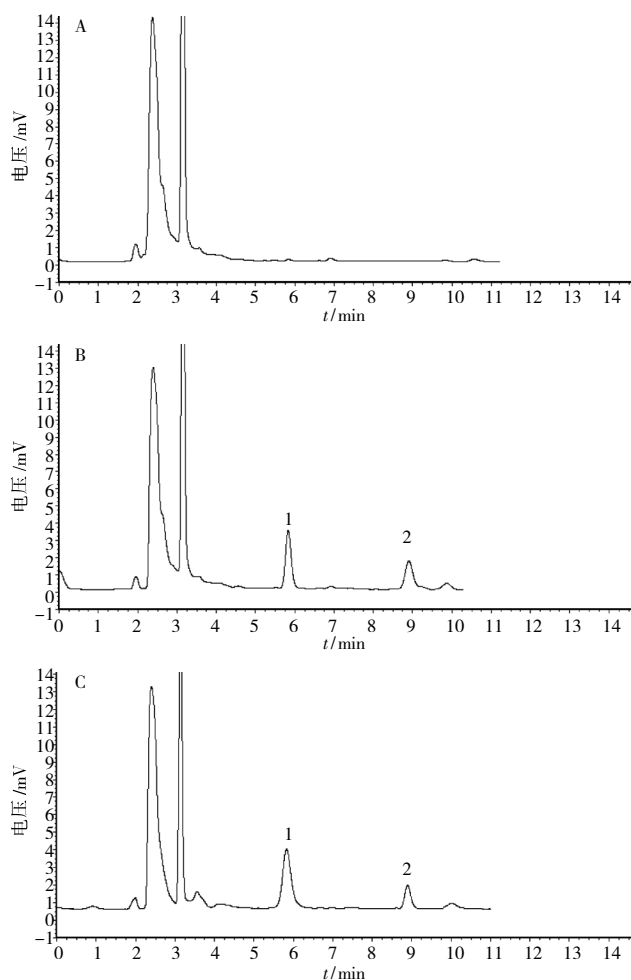
LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司, 包括 SPD-20A 紫外可见检测仪, LC-20A 高压恒流泵, 浙江大学智达信息工程有限公司 N2000 色谱数据工作站); KH-100DE 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); TGL-16G 高速离心机(上海安亭科学仪器厂); 80-2 型低速离心机(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂); XW-80A 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司); XHF-D 型高速分散器(宁波新芝生物科技股份有限公司); AG-285 电子天平(瑞典 METTLER 公司); HSC-12A 水浴氮吹仪(天津恒奥科技发展有限公司)。

马钱子碱(美国 Sigma 公司, 纯度 > 96 %); 马钱子碱、石杉碱甲对照品(中国药品生物制品检定所); 乙腈(色谱纯, 美国 Tedia 公司)。大鼠, 体质量 180~200 g, 雌雄各半, 上海斯莱克实验动物有限公司, 合格证号: SCXK(沪)2003-0003。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 汉邦 C₁₈ 预柱; 流动相: 乙腈 -0.01 mol·L⁻¹ 庚烷磺酸钠与 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾等量混合溶液(用 10 % 磷酸调 pH 值 2.8)(24 : 76); 检测波长: 264 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 进样量: 50 μL。

2.2 样品处理 分离血浆, 大鼠处死后取心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、脑、小肠、睾丸、卵巢, 生理盐水洗净, 滤纸吸干, 称质量, -20 °C 保存, 备用。按脏器质量与生理盐水体积比为 1 : 2 加入生理盐水制成匀浆, 混匀后精密吸取 0.5 mL 组织匀浆或血浆加入内标(40 μg·mL⁻¹ 石杉碱甲)20 μL, 加入氨水 50 μL, 涡旋 30 s, 加 2.5 mL 三氯甲烷涡旋 3 min, 超声 20 min 后静置 1 h, 4000 r·min⁻¹ 离心 10 min 取下层液, 残渣加 2 mL 三氯甲烷重复操作。合并 2 次下层液, 50 °C 恒温水浴氮气吹干, 再用 100 μL 甲醇溶解残渣, 涡旋 30 s, 12000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清 50 μL 进样。小肠组织的 HPLC



A. 空白组织; B. 空白组织 + 马钱子碱 + 内标(石杉碱甲); C. 给药后小肠组织样品。1. 石杉碱甲; 2. 马钱子碱

图 1 小肠组织中马钱子碱的 HPLC 图

Figure 1 HPLC analysis of brucine in small intestine

色谱图见图 1, 可见内源性杂质对马钱子碱的含量测定无干扰, 其他组织中也未见内源性杂质干扰。

2.3 标准曲线制备 在空白心、肝、脾、肺、肾、胃、小肠、睾丸、卵巢组织匀浆中加入适量马钱子碱标准溶液制成 50, 100, 180, 300, 600, 1200, 2000, 8000, 20000 ng·mL⁻¹ 的组织匀浆, 在空白血浆及脑组织中加入适量马钱子碱标准溶液配制成 50, 100, 180, 300, 600, 1200, 2000 ng·mL⁻¹ 的组织匀浆。按 2.2 项下操作, HPLC 测定, 以马钱子碱与内标峰高比值(Y)为纵坐标, 以马钱子碱浓度(C, ng·mL⁻¹)为横坐标进行回归计算。结果表明各脏器在各自浓度范围内线性关系良好, 见表 1。

2.4 精密度考察 取各空白组织加入马钱子碱标准溶液配制成 50, 2000, 20000 ng·mL⁻¹ 3 个浓度组织样品各 3 份, 其中空白血浆及脑组织中加入马钱子碱对照品溶液配制成 50, 300, 2000 ng·mL⁻¹ 3 个浓度

表 1 组织及血浆中马钱子碱标准曲线及线性范围

Table 1 Standard curve and linear range of brucine in the tissues and serum

组织及血浆	标准曲线	<i>r</i>	线性范围 /ng·mL ⁻¹
心	<i>Y</i> =0.06647+0.003085 <i>C</i>	0.9941	50–20000
肝	<i>Y</i> =0.01912+0.003202 <i>C</i>	0.9921	50–20000
脾	<i>Y</i> =0.04137+0.003044 <i>C</i>	0.9951	50–20000
肺	<i>Y</i> =0.05279+0.003393 <i>C</i>	0.9901	50–20000
肾	<i>Y</i> =0.03382+0.003364 <i>C</i>	0.9942	50–20000
胃	<i>Y</i> =0.08204+0.00294 <i>C</i>	0.9936	50–20000
小肠	<i>Y</i> =0.1443+0.003539 <i>C</i>	0.9935	50–20000
脑	<i>Y</i> =0.03764+0.004565 <i>C</i>	0.9985	50–2000
睾丸	<i>Y</i> =0.02477+0.00332 <i>C</i>	0.9914	50–20000
卵巢	<i>Y</i> =-0.09158+0.003504 <i>C</i>	0.9943	50–20000
血浆	<i>Y</i> =0.00915+ 0.003351 <i>C</i>	0.9993	50–2000

组织样品各 3 份，按 2.2 项下进样测定，于同 1 d 内测定 5 次，计算 3 个浓度的日内精密度的；连续测定 5 d，每天 1 次，计算 3 个浓度的日间精密度的，结果见表 2。可见不同组织中高、中、低 3 个浓度马钱子碱日内与日间精密度的(RSD)均小于 10 %。

2.5 回收率考察 按 2.4 项下制备低、中、高 3 个浓度的标准组织样品，按 2.2 项下进样测定，分别计算方法回收率和提取回收率，见表 3。方法回收率在 80 %~120 % 范围内，提取回收率均大于 70 %，能够满足体内分析的需要。

2.6 组织分布研究 5 组大鼠(每组 6 只，雌雄各半)尾静脉注射 1 mg·mL⁻¹ 马钱子碱生理盐水溶液 5 mg·kg⁻¹，分别于给药后 5，20，60，120，180 min 各取 1 组大鼠取血浆和组织样品，测定马钱子碱浓度，结果见图 2。5 min 时各组织中马钱子碱浓度最高，之后随时间延长逐渐降低。马钱子碱在肾中浓度最高，在脑中浓度最低。

采用梯形法计算马钱子碱在各组织中的曲线下

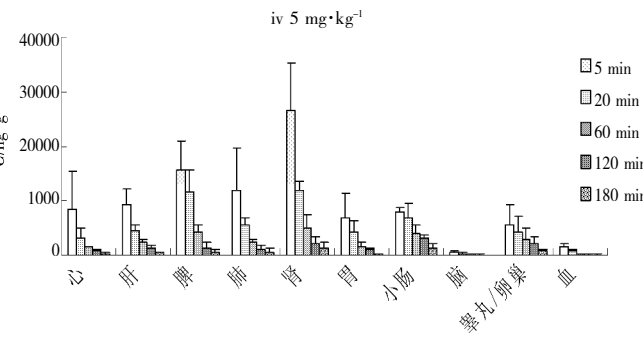


图 2 马钱子碱在大鼠组织中的分布(*n*=6)

Figure 2 Tissue distribution of brucine in rats

表 2 精密度试验结果(*n*=5)

Table 2 Results of precision test

组织及血浆	浓度 /ng·mL ⁻¹	精密度(RSD)%	
		日内	日间
心	50	5.36	8.08
	2000	1.83	4.38
	20000	1.21	0.78
肝	50	5.95	7.80
	2000	1.15	1.76
	20000	0.41	0.54
脾	50	5.51	3.88
	2000	1.14	5.98
	20000	0.45	0.97
肺	50	8.41	4.38
	2000	0.40	8.88
	20000	0.77	0.45
肾	50	2.41	3.25
	2000	0.76	7.25
	20000	0.73	0.17
胃	50	1.51	1.41
	2000	0.43	5.14
	20000	2.26	0.35
小肠	50	2.83	3.86
	2000	1.15	7.85
	20000	0.48	1.58
睾丸	50	5.50	3.94
	2000	1.40	0.44
	20000	1.82	0.25
卵巢	50	3.10	9.35
	2000	1.71	0.55
	20000	2.06	2.15
脑	50	1.97	9.94
	300	0.62	1.42
	2000	0.38	1.59
血浆	50	2.30	3.58
	300	0.74	3.79
	2000	1.15	1.74

面积(AUC)，并计算各组织中马钱子碱 AUC 所占的比例。结果表明，肾脏占比最高，为 22 %，提示肾排泄可能是马钱子碱最主要的排泄途径；其次是脾和小肠，分别占 18 %和 16 %；值得注意的是，在性腺(睾丸 / 卵巢)中马钱子碱分布较多，达到 11 %，提示需考察马钱子碱是否具有生殖毒性；马钱子碱在脑中(其毒性的靶部位)分布极少，仅占 1 %。马钱子碱在肺、肝、胃、心、血中的分布分别占 11 %、9 %、8 %、3 %和 1 %。除了脑以外，其他组织中的药物浓度均高于血浆，也验证了马钱子碱具有较好的组织亲和性，在组织中分布广泛。

表3 回收率试验结果($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Results of recovery test

组织及血浆	浓度 /ng·mL ⁻¹	回收率/%	
		提取回收率	方法回收率
心	50	87.28 ± 12.66	81.23 ± 16.51
	2000	86.79 ± 5.03	111.62 ± 2.83
	20000	88.32 ± 11.35	95.15 ± 4.04
肝	50	87.36 ± 3.60	90.83 ± 3.89
	2000	84.62 ± 10.49	108.46 ± 14.99
	20000	90.39 ± 1.37	80.99 ± 11.42
脾	50	91.92 ± 6.77	83.51 ± 7.00
	2000	81.08 ± 10.68	109.22 ± 5.06
	20000	94.21 ± 6.93	86.47 ± 4.29
肺	50	89.81 ± 12.99	96.97 ± 16.89
	2000	84.53 ± 3.28	107.72 ± 8.49
	20000	99.61 ± 1.32	81.18 ± 0.47
肾	50	81.83 ± 12.99	99.87 ± 3.82
	2000	85.33 ± 13.79	112.22 ± 6.81
	20000	91.46 ± 4.21	93.89 ± 8.33
胃	50	86.32 ± 3.76	95.56 ± 8.38
	2000	89.78 ± 6.22	108.92 ± 5.15
	20000	92.66 ± 10.04	84.68 ± 6.53
小肠	50	88.26 ± 7.76	97.24 ± 9.17
	2000	87.30 ± 4.91	108.51 ± 4.21
	20000	88.49 ± 3.62	82.79 ± 3.23
睾丸	50	92.18 ± 18.15	118.36 ± 19.16
	2000	93.43 ± 5.82	115.77 ± 1.51
	20000	100.89 ± 9.29	87.30 ± 4.95
卵巢	50	76.80 ± 3.70	89.77 ± 10.93
	2000	84.00 ± 9.17	108.15 ± 3.55
	20000	94.70 ± 4.93	99.95 ± 6.83
脑	50	71.63 ± 3.89	103.36 ± 8.83
	300	78.12 ± 4.71	94.85 ± 7.09
	2000	75.25 ± 7.37	99.96 ± 5.25
血	50	86.01 ± 8.63	100.51 ± 6.52
	300	90.63 ± 1.40	97.16 ± 6.06
	2000	100.94 ± 2.33	100.38 ± 6.83

3 讨论

马钱子碱多剂量(2.5, 5, 10 mg·kg⁻¹)静脉注射给药后的药动学研究^[5]表明,当剂量达到 10 mg·kg⁻¹时,出现了非线性药动学过程,因此本文中的给药剂量设定为 5 mg·kg⁻¹。

有文献^[6]采用含丙二醇的醋酐对马钱子碱进行衍生化处理和荧光分光光度法测定其在小鼠体内的组

织分布特性,但该方法特异性不高,样品处理有一定的危险性,测得的马钱子碱在脑中的浓度亦很高,这可能与荧光分光光度法专属性不高有关。采用 UPLC-MS/MS 方法研究证明马钱子碱注射给药后小鼠脑中浓度远低于血浆中浓度^[7]。

马钱子碱与马钱子的另一主要成分土的宁结构相似但极性更强,两者均具有中枢神经毒性,但土的宁的半数致死量(LD₅₀)是马钱子碱的 1/50^[8],这可能与土的宁亲脂性更强,更易通过血脑屏障有关。

本课题组前期曾经报道马钱子总生物碱静脉注射给药后在大鼠体内的分布^[9],其研究结果也表明,马钱子总生物碱中的马钱子碱在全身大部分组织中都有分布,但该报道未测定血药浓度。

本研究结果表明,马钱子碱具有很高的组织亲和性,而且在不同组织中的分布差异较大,肾组织浓度最高,提示肾脏很可能是其主要的排泄途径;脾组织浓度也较高,可能与马钱子碱具有免疫调节作用有关;在性腺中亦有一定分布,提示其生殖毒性有必要进行考察。

参考文献:

- [1] 徐金华,陈军,蔡宝昌. 马钱子碱的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(3): 213-216.
- [2] 杨柏灿,王秋云,沈杰,等. 运用纳米马钱子碱脂质体治疗类风湿性关节炎的临床研究[J]. 浙江中医杂志, 2007, 42(1): 24-25.
- [3] 陈军,胡巍,蔡宝昌,等. 马钱子碱在大鼠体内的药动学[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(10): 778-780.
- [4] 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动学研究[J]. 中草药, 2010, 41(8): 1350-1352.
- [5] Chen J, Xiao HL, Hu RR, et al. Pharmacokinetics of brucine after intravenous and oral administration to rats[J]. Fitoterapia, 2011, 82: 1302-1308.
- [6] 李晓天,张丽容,王天奎,等. 马钱子碱在小鼠体内的组织分布[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(3): 342-344.
- [7] 刘艳文,张文渊,颜苗,等. UPLC-MS/MS 法测定小鼠血浆及脑组织中马钱子碱浓度[J]. 中南药学, 2010, 8(5): 321-325.
- [8] 马骋,何亚维,蔡宝昌,等. 土的宁和马钱子碱及其氮氧化合物的毒性比较[J]. 南京中医学院学报, 1994, 10(2): 37-38.
- [9] 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.

(编辑:梁进权)