

· 药物代谢 ·

磷脂组成对马钱子总生物碱隐形脂质体静脉注射后 马钱子碱组织分布的影响

瞿叶清¹, 陈军^{2*}, 侯婷², 董洁², 蔡宝昌²

(1. 南京大学医学院附属鼓楼医院, 南京 210008; 2. 南京中医药大学药学院, 南京 210023)

[摘要] **目的:**考察磷脂组成对马钱子总生物碱隐形脂质体静脉注射后马钱子碱在体内分布的影响。**方法:**采用硫酸铵梯度法和隐形脂质体技术制备马钱子总生物碱脂质体,除去游离药物后,利用HPLC测定马钱子碱的含量,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液(24:76),检测波长264 nm。比较马钱子总生物碱溶液和不同磷脂组成马钱子总生物碱隐形脂质体静脉注射给药后马钱子碱的组织分布情况。**结果:**不同磷脂组成脂质体中马钱子碱占总生物碱的质量分数在26%~31%。与大豆磷脂隐形脂质体相比,马钱子总生物碱复合磷脂隐形脂质体静脉注射给药5 min后在血液和小肠中的浓度分别增加了2.35,1.34倍;而氢化大豆磷脂隐形脂质体在血液中的浓度极显著增加,给药后5 min的浓度增加了8.52倍,并且在脾、肺、心等组织中的浓度也明显增加,在小肠中浓度显著下降。**结论:**磷脂组成对马钱子总生物碱隐形脂质体的体内分布有显著影响。

[关键词] 马钱子; 总生物碱; 马钱子碱; 隐形脂质体; 石杉碱甲

[中图分类号] R969.1;R945;R283.6;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)06-0075-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016060075

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160126.1610.010.html>

[网络出版时间] 2016-01-26 16:10

Effect of Phospholipids Composition on Tissue Distribution of Brucine in Rats After Intravenous Administration of Stealth Liposomes Containing Total Alkaloids from Strychni Semen

QU Ye-qing¹, CHEN Jun^{2*}, HOU Ting², DONG Jie², CAI Bao-chang²

(1. Nanjing Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China;

2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect the of phospholipids composition on tissue distribution characteristics of brucine in stealth liposomes containing total alkaloids from Strychni Semen. **Method:** Liposomes containing total alkaloids from Strychni Semen were prepared by ammonium sulfate transmembrane gradients and stealth liposome technique. Contents of total alkaloids and brucine in liposomes were determined and compared after free drug was removed. After intravenous administration of total alkaloids solution or stealth liposomes with different composition, tissue and plasma samples were drawn at different intervals and the concentration of brucine were determined by a validated HPLC method. **Result:** Ratio of brucine to total alkaloids in liposomes, in the range of 26%~31%, hardly varied with phospholipids composition. Compared with soybean phosphatidylcholine (SPC) stealth liposomes, after intravenous administration of stealth liposomes composed of both hydrogenated

[收稿日期] 20150629(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30701111,81403116)

[第一作者] 瞿叶清, 硕士, 医师, 从事动物实验研究, Tel:025-83105986, E-mail:quyeqing1980@163.com

[通讯作者] * 陈军, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药新型给药系统研究, Tel:025-85811050, E-mail:chenjun75@163.com

soybean phosphatidylcholine (HSPC) and SPC, the concentration of brucine in small intestine and plasma at 5 min were significantly increased 1.34-fold and 2.35-fold, respectively. Moreover, following administration of HSPC stealth liposomes containing total alkaloids, plasma concentration of brucine was much higher than other liposomes. Compared with SPC liposomes, plasma concentration of brucine at 5 min increased by 8.52-fold. In addition, brucine concentration in spleen, lung and heart were also significantly increased and those in small intestine were significantly reduced. **Conclusion:** Phospholipids composition is the key factor which influences tissue distribution of brucine after intravenous administration of stealth liposomes containing total alkaloids from *Strychni Semen*.

[**Key words**] *Strychni Semen*; total alkaloids; brucine; stealth liposomes; huperzine A

磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC) 是制备脂质体的常用材料, 常规脂质体主要采用单一磷脂成分如大豆磷脂 (SPC) 制备。复合磷脂脂质体技术是同时应用 2 种不同相变温度的 PC 制备脂质体, 与单一磷脂脂质体相比, 具有载药量高的特性^[1], 还可灵活调节脂质体的相变温度^[2]。马钱子又名番木鳖, 始载于《本草纲目·卷十八》, 是马钱科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* 的干燥成熟种子, 具有确切的抗肿瘤作用, 其主要有效部位为总生物碱, 对临床常见的肿瘤细胞均具有抑制活性^[3]。本课题组前期尝试应用复合磷脂脂质体作为马钱子总生物碱的载体, 同时进行隐形修饰, 结果表明与常规单一磷脂脂质体相比, 能够显著提高包封率和稳定性^[4], 改善体内药动学性质^[5], 提高抗肿瘤效果^[6]。在此基础上, 本实验进一步比较了磷脂组成对马钱子总生物碱隐形脂质体体内分布的影响。

土的宁和马钱子碱是马钱子总生物碱中最主要的 2 种成分, 约合计占总生物碱质量分数的 70%。前期研究表明马钱子碱的抗肿瘤效果显著优于土的宁^[7], 而毒性却仅为土的宁的 1/50^[8]。从马钱子总生物碱中去除土的宁后, 可显著提高治疗指数^[9], 同时马钱子碱的研究与开发也是一个热点^[10], 故本实验主要选择马钱子碱为指标性成分。

1 材料

LC-20A 型高效液相色谱仪 (日本岛津), WH-3 微型旋涡混合仪 (上海沪西分析仪器厂), HSC-12A 型氮吹仪 (天津市恒奥科技发展有限公司)。马钱子总生物碱 (自制, 采用氨性三氯甲烷法从制马钱子中提取并纯化^[3]), 马钱子碱、石杉碱甲对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号分别为 110706-200505, 100243-200601); 大豆磷脂 (SPC), 氢化大豆磷脂 (HSPC) 和二硬脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG2000, 纯度 > 98%) (德国 Lipoid 公司, 批号分别为 790627-6, 256257-1, 256310-1)。

SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 250 ~ 300 g, 由上海斯莱

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 马钱子总生物碱复合磷脂隐形脂质体的制备

按一定质量比称取 HSPC 和 SPC (HSPC 与 SPC 摩尔比 1:3), 胆固醇, DSPE-PEG2000, 加入无水乙醇, 适当超声使其溶解, 注入 0.2 mol·L⁻¹ 硫酸铵溶液中, 60 °C 磁力搅拌 45 min 以除去乙醇, 探头超声匀化后, 加 10 倍量 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 透析 4 次, 每次 2 h, 以除去外水相硫酸铵, 制得空白复合磷脂隐形脂质体。取适量马钱子总生物碱与空白脂质体混匀, 恒温水浴振荡载药, 得马钱子总生物碱复合磷脂隐形脂质体。除了磷脂组成为单一的 HSPC 或 SPC 外, 其他处方与工艺不变, 同法制备了马钱子总生物碱 HSPC 或 SPC 隐形脂质体。

2.2 成分的含量测定 采用凝胶柱层析法除去游离药物后, 利用 UV^[11] 测定脂质体中马钱子总生物碱的含量, HPLC^[12] 测定脂质体中马钱子碱的含量, 计算马钱子碱在总生物碱中的质量分数。结果表明马钱子总生物碱游离药物和 3 种不同磷脂组成隐形脂质体中的马钱子碱比例基本相同, 均在 26% ~ 31%。

2.3 马钱子总生物碱复合磷脂隐形脂质体的检测

2.3.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 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液 (用 10% 磷酸调 pH 2.8) (24:76), 检测波长 264 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样量 20 μL。

2.3.2 组织样品处理 按脏器质量与生理盐水体积比 1:2 加入生理盐水制成匀浆, 取组织匀浆 0.5 mL, 加入内标 (40 mg·L⁻¹ 石杉碱甲-甲醇溶液) 20 μL, 加入氨水 50 μL (血样为氨水体积的 1/5), 涡旋 30 s, 加三氯甲烷 2.5 mL 涡旋 3 min, 超声 20 min 后静置 1 h, 于 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取下层液; 残渣加三氯甲烷 2 mL 重复操作, 合并 2 次下层液, 50 °C 恒

温水浴氮气吹干,加入甲醇 100 μL 复溶,于 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液进样。

2.3.3 方法专属性 取大鼠空白匀浆,按 2.3.2 项下方法处理,按 2.3.1 项下色谱条件测定。将一定浓度的马钱子碱对照品溶液加入空白匀浆中,同法操作;同法得到大鼠给药后的色谱图。结果显示内标、马钱子碱色谱峰峰形良好,内源性物质无干扰。

2.3.4 标准曲线 在组织中和血浆中分别加入马钱子碱对照品溶液,使其质量浓度分别为 0.05, 0.10, 0.18, 0.30, 0.60, 1.20, 2.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,按 2.3.2 项下方法处理,按 2.3.1 项下色谱条件测定,以马钱子碱质量浓度为横坐标,马钱子碱与石杉碱甲的峰面积比为纵坐标,得各组织标准曲线方程,见表 1,线性范围均为 0.05 ~ 2.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 1 不同组织中马钱子碱的标准曲线

Table 1 Calibration curves of brucine in different tissues

组织	回归方程	r
心	$Y = 0.0033X + 0.0320$	0.9910
肝	$Y = 0.0034X + 0.0033$	0.9977
脾	$Y = 0.0033X + 0.0245$	0.9981
肺	$Y = 0.0040X + 0.0129$	0.9980
肾	$Y = 0.0035X + 0.0266$	0.9976
胃	$Y = 0.0031X + 0.0664$	0.9992
小肠	$Y = 0.0038X + 0.1231$	0.9984
血浆	$Y = 0.0034X - 0.0159$	0.9997

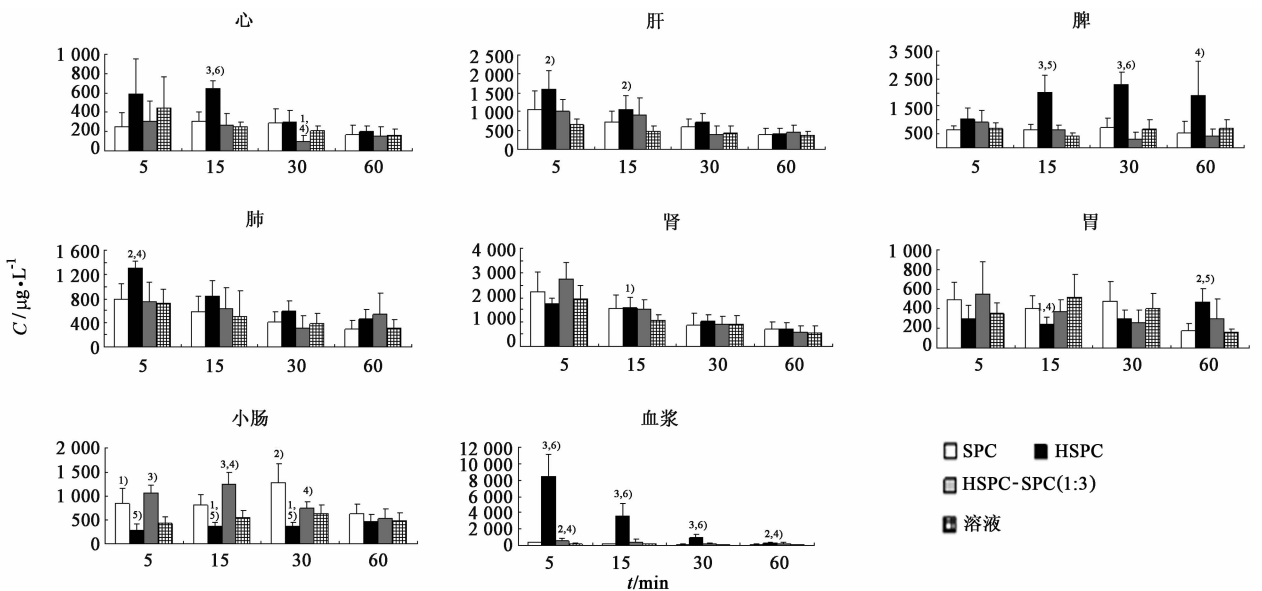
2.3.5 回收率与精密度考察 取空白组织和血浆加入马钱子碱对照品溶液,配成低、中、高质量浓度

(0.05, 0.30, 2.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的标准组织样品各 3 份,按 2.3.2 项下方法处理,按 2.3.1 项下条件测定,每日 5 次,连续 3 d,计算日内及日间精密密度、方法回收率、提取回收率。结果马钱子碱的日内精密密度 $\text{RSD} < 6.0\%$, 日间精密密度 $\text{RSD} < 10.4\%$ 。马钱子碱提取回收率 78.12% ~ 95.42%, 方法回收率 90.38% ~ 104.84%。

2.3.6 稳定性考察 取含 0.30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 马钱子碱的标准组织样品,于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存,反复冻融 3 次,按 2.3.2 项下方法处理,按 2.3.1 项下色谱条件测定;另含 0.30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 马钱子碱的标准组织样品,按 2.3.2 项下方法处理,分别于复溶后 0, 2, 4, 8, 24 h 按 2.3.1 项下条件测定。表明马钱子碱峰面积的 RSD 分别在 4.23% ~ 10.81% 和 2.24% ~ 5.68%, 表明复溶与冻溶稳定性良好。

2.4 组织分布研究 取 80 只 SD 大鼠,随机分成 16 组,每组 5 只,分别给予马钱子总生物碱溶液,马钱子总生物碱复合磷脂,SPC 和 HSPC 隐形脂质体。按剂量 1.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 经大鼠尾静脉推注,分别于给药后 5, 15, 30, 60 min 处死 1 组动物,取血,分离血浆,并摘取组织样品,经 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻保存。按 2.3.2 项下方法处理,按 2.3.1 项下条件测定,见图 1。

结果显示马钱子总生物碱 HSPC 隐形脂质体静脉注射后的血药浓度远高于其他脂质体,与 SPC 隐形脂质体相比,给药后 5 min 时马钱子碱的血药浓度增加了 8.52 倍。而复合磷脂 [HSPC-SPC(1:3)]



与马钱子总生物碱溶液组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$; 与 SPC 隐形脂质体组比较⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$, ⁶⁾ $P < 0.001$

图 1 不同马钱子总生物碱隐形脂质体给药后马钱子碱在大鼠体内的分布 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Tissue distribution of brucine after intravenous administration of total alkaloids liposomes with different phospholipids composition ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

隐形脂质体的血药浓度在 5 min 时显著高于 SPC 脂质体和溶液。与马钱子总生物碱脂质体在血浆中的稳定性试验结果相符^[4],即 HSPC 隐形脂质体 > 复合磷脂隐形脂质体 > SPC 隐形脂质体。

虽然血药浓度有很大差别,但在其他组织中这一差别不及在血浆中明显,例如在肾中,各个给药组的浓度无很大差异。但是 HSPC 隐形脂质体给药后,马钱子碱在脾中的浓度均显著高于其他组,在肺、心中也有所增加,而在小肠中的浓度显著降低。

值得注意的是,除了血浆浓度以外,复合磷脂隐形脂质体给药 15 min 后马钱子碱在小肠内的组织分布显著高于溶液组和 SPC 脂质体组和溶液组。与 SPC 脂质体相比,马钱子总生物碱复合磷脂隐形脂质体静脉注射给药 5 min 后在血液和小肠中的浓度分别增加了 2.35,1.34 倍。

3 讨论

前期研究表明静脉注射不同磷脂组成马钱子总生物碱脂质体后,马钱子碱在血浆中的药动学迥异^[5]。马钱子总生物碱 HPSC 脂质体给药后,马钱子碱在血浆中的浓度远高于其他脂质体,本文中也发现 HSPC 隐形脂质体给药后马钱子碱的血药浓度高于其他给药组,特别是给药后 5 min。HSPC 是高相变温度(53 ℃)PC,所制成的脂质体在血浆中稳定性最高,而马钱子碱具有一定的极性,难于通过高相变温度的脂质体膜。但在组织中 HSPC 隐形脂质体给药后马钱子碱的浓度却无同等幅度的提高,说明脂质体主要通过释放出药物后分布入组织。

马钱子总生物碱复合磷脂隐形脂质体给药后,15 min 时间点在小肠中的组织分布显著高于其他脂质体,其机制还有待于进一步研究确认。前期研究表明马钱子碱在脑组织中的浓度非常低,显著低于土的宁,本文尝试测定脑中的马钱子碱浓度,结果表明各组给药后仅能测得到个别时间点的浓度,故在脑中的分布未列出。为了保证抗肿瘤效果,隐形脂质体静脉注射给药后,除在血液中外,希望在其他组织中的分布尽可能低,这样有利于通过增加渗透与滞留效应向肿瘤中转运。本课题组在荷瘤小鼠体内也进行了组织分布研究,结果表明不同制剂给药后马钱子碱在肿瘤中的浓度排序为 HSPC 隐形脂质体 > 复合磷脂隐形脂质体 > SPC 隐形脂质体^[13]。复合磷脂脂质体自本课题组 2006 年报道以来^[14],在抗肿瘤载体领域已经取得了较多的应用^[15-17]。

【参考文献】

[1] Kan P, Wang A J, Chen W K, et al. Liposome for

incorporating large amounts of hydrophobic substances: USA,US2004126886[P]. 2004-07-01.

- [2] Chen J, Cheng D, Li J, et al. Influence of lipid composition on the phase transition temperature of liposomes composed of both DPPC and HSPC[J]. Drug Dev Ind Pharm,2013,39(2):197-204.
- [3] 祁艳,陈军,蔡宝昌,等. 马钱子总生物碱提取纯化工艺及抗肿瘤研究[J]. 中成药,2010,32(3):405-408.
- [4] 陈军,张婷,蔡宝昌,等. 马钱子总生物碱复合磷脂脂质体的药剂学性质研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(1):32-36.
- [5] 侯婷,陈军,蔡宝昌,等. 马钱子总生物碱复合磷脂脂质体静脉注射后马钱子碱在大鼠体内的药物动力学研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(10):1353-1357.
- [6] 陈军,林爱华,侯婷,等. 磷脂组成对马钱子总生物碱隐形脂质体抗肿瘤作用的影响[J]. 中成药,2012,34(2):238-241.
- [7] 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.
- [8] 马骋,何亚维,蔡宝昌,等. 土的宁和马钱子碱及其氮氧化物的毒性比较[J]. 南京中医学院学报,1994,10(2):37-38.
- [9] Chen J, Qu Y G, Wang D Y, et al. Pharmacological evaluation of total alkaloids from nux vomica; effect of reducing strychnine contents [J]. Molecules, 2014, 19(4):4395-4408.
- [10] 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.
- [11] 陈军,苏璇,蔡宝昌,等. 马钱子总生物碱脂质体的含量与包封率测定[J]. 中药新药与临床药理,2009,20(3):249-252.
- [12] 杨希雄,陈军,胡君寅,等. 高效液相色谱法同时测定马钱子总生物碱脂质体中土的宁和马钱子碱的含量[J]. 中国医院药学杂志,2008,28(19):1641-1644.
- [13] Li J, Chen J, Yang T, et al. Preparation, characterization and tissue distribution of brucine stealth liposomes with different lipid composition [J]. Pharm Dev Technol, 2013,18(4):772-778.
- [14] 陈军,平其能,蔡宝昌. 9-硝基喜树碱复合磷脂脂质体的研究[C]. 广州:中国药学会学术年会,2006.
- [15] 曾诚,黄伟,何承辉,等. 复合磷脂脂质体的研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2015,42(1):91-95.
- [16] 瞿叶清,陈军,林爱华,等. 马钱子总生物碱复合磷脂脂质体的抗肿瘤作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):143-145.
- [17] 程娜娜,陆逸林,陈军,等. 莪术油复合磷脂脂质体的制备工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(18):14-17.

【责任编辑 刘德文】