



马钱子生物碱血浆蛋白结合率的测定与比较

王绚^{1,2}, 何超芹¹, 陈亚¹, 陈军^{1,2*}, 蔡宝昌^{2*}

(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)

[摘要] 目的:测定马钱子总生物碱中主要有效成分马钱子碱和土的宁的血浆蛋白结合率,并与同浓度单成分的血浆蛋白结合率进行比较。方法:采用超滤法和高效液相色谱法对马钱子生物碱在大鼠血浆中的血浆蛋白结合率进行测定。结果:单成分的马钱子碱在 0.520, 1.300, 2.600 mg · L⁻¹ 下的血浆蛋白结合率分别为 (65.60 ± 3.01)%, (68.20 ± 7.80)%, (59.58 ± 3.78)%。单成分的土的宁在 0.936, 2.340, 4.680 mg · L⁻¹ 下的血浆蛋白结合率分别为 (66.17 ± 6.36)%, (67.10 ± 2.52)%, (57.21 ± 0.79)%。马钱子总生物碱中马钱子碱在 0.519, 1.288, 2.607 mg · L⁻¹ 下的血浆蛋白结合率分别为 (62.19 ± 2.45)%, (69.55 ± 5.84)%, (61.76 ± 3.68)%;马钱子总生物碱中土的宁在 0.940, 2.338, 4.674 mg · L⁻¹ 下的血浆蛋白结合率分别为 (54.79 ± 3.55)%, (57.13 ± 4.49)%, (59.31 ± 3.65)%。结论:马钱子碱和土的宁与血浆蛋白具有中等强度的结合,马钱子总生物碱中马钱子碱与同浓度单体相比,蛋白结合率差异不大;总碱中土的宁与同浓度单体相比,蛋白结合率有所降低。

[关键词] 马钱子碱;土的宁;马钱子总生物碱;血浆蛋白结合率;超滤法;高效液相色谱法

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* L. 的干燥成熟种子,具有通络止痛、散结消肿之功效,在中医药临床上得到广泛应用。马钱子总生物碱是公认的马钱子的主要有效部位,目前的研究表明:马钱子总生物碱中至少 16 种生物碱成分^[1],主要成分是土的宁和马钱子碱,合计约占总生物碱的 70%,具有确切的抗肿瘤作用^[2]。药物与血浆蛋白的结合率是药动学研究的重要参数,它对药物的组织分布、生物转化、代谢等均产生重要影响,对药物的消除半衰期也有影响,更重要的是它与药物的药理作用强度密切相关。因此它是新药临床评价不可缺少的指标,尤其对毒性药物的临床应用具有极其重要的指导意义。因此本研究采用超滤法测定并比较了马钱子总生物碱中马钱子碱和土的宁及相应单体的血浆蛋白结合率,拟为临床合理用药提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器 岛津 LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津);N2000 色谱工作站(浙大智达信息工程有限公司);BS124S 电子天平(德国赛多利斯公司);HH-4 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);TDL80-2B 型离心机(上海安亭科学仪器厂);TGL-16G 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂);WH-3 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂);Amicon Ultra-4 型超滤管(Minipore, 10K;100K)。

1.2 药品与试剂 马钱子碱(批号 110706-200505),土的宁对照品(批号 110705-200306),均购自中国药品生物制品检定所;马钱子购于南京药业股份有限公司,经南京中医药大学蔡宝昌教授鉴定为马钱科植物马钱 *S. nux-vomica* 的干燥成熟种子;乙腈(色谱纯,美国 TEDIA 公司);其余试剂均为分析纯。

1.3 动物 SD 大鼠,体重 180 ~ 220 g,雌雄兼用,上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物许可证 SCXK(沪)2007-0005。大鼠眼眶取血,肝素抗凝,4 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,分离血浆备用。

2 方法与结果

2.1 马钱子总生物碱的制备与分析^[3] 取马钱子制品粉末(砂烫法炮制,过 20 目筛,45 °C 干燥 6 h)约 10 g,精密称重,加 15% 氨水 1 mL 湿润,鼻塞静

[稿件编号] 20100618009

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30701111);江苏省大学生创新训练计划项目(380)

[通信作者] *陈军,副教授, Tel: (025)85811050, E-mail: chenjun75@163.com; *蔡宝昌,教授, Tel: (025)85811112, E-mail: beccai@126.com

[作者简介] 王绚,硕士,主要从事中药新剂型研究, E-mail: xuan_jeanne@163.com



置3 h,加三氯甲烷50 mL,置40 ℃恒温磁力搅拌提取12 h,提取液过滤,残渣+15%氨水1 mL+三氯甲烷50 mL,重复提取5次。合并提取液,减压回收三氯甲烷,真空干燥得提取物,精密称重。用1 mol·L⁻¹盐酸超声溶解,4 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液,用40% NaOH调pH到12.0,三氯甲烷萃取,合并三氯甲烷液,减压回收溶剂,真空干燥得总生物碱提取物,精密称重,平均得率3.49% (n=10)。取总生物碱提取物,用三氯甲烷溶解配成1 g·L⁻¹的溶液,精密吸取2 mL,用甲醇稀释至10 mL,摇匀按2005年版《中国药典》一部规定的方法^[4]采用HPLC测定马钱子碱和土的宁的含量,结果表明,在总生物碱提取物中,土的宁占46.75%,马钱子碱占26.50% (n=10)。将烘干的马钱子总生物碱26.1 mg用三氯甲烷定容至25 mL量瓶中,即得1.044 g·L⁻¹的马钱子总生物碱三氯甲烷储备液。

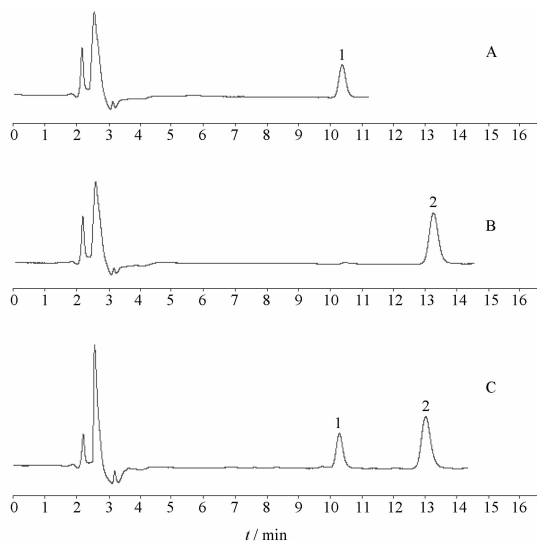
2.2 对照品溶液的配制 精密称取10.4 mg马钱子碱对照品,甲醇定容至10 mL量瓶中,即得浓度为1.04 g·L⁻¹的马钱子碱对照品储备液,备用。精密称取11.7 mg土的宁对照品,甲醇定容至10 mL量瓶中即得浓度为1.17 g·L⁻¹的土的宁对照品储备液,备用。

2.3 磷酸盐缓冲液的配制 取十二水合磷酸氢二钠19.028 g,磷酸二氢钠2.08 g,氯化钠4.4 g,加水至1 000 mL,即得pH 7.4的等渗PBS液。

2.4 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(用10%磷酸调pH 2.8,24:76),检测波长264 nm,流速1.0 mL·min⁻¹,进样20 μL,柱温35 ℃。

2.5 方法专属性考察 本试验中马钱子碱、土的宁、马钱子总生物碱PBS溶液的HPLC色谱图峰形良好,无杂峰干扰测定,具有较高的特异性,分析条件可行,相关色谱图见图1。

2.6 线性关系考察 精密吸取马钱子碱和土的宁对照品储备液0.5 mL于10 mL量瓶中,加入PBS至刻度,摇匀。再精密吸取不同体积的上述混标溶液,用PBS分别稀释到0.2,0.4,0.6,0.8,1,2,5 mg·L⁻¹,HPLC测定峰面积,以峰面积A对浓度C进行回归得标准曲线。马钱子碱 $A = 17435C + 226.97, r = 0.9997$,土的宁 $A = 20372C + 72.347, r = 0.9997$ 。供试液质量分数在0.20~5.00



A. 马钱子碱对照品;B. 土的宁对照品;C. 马钱子总生物碱对照品;1. 马钱子碱;2. 土的宁。

图1 马钱子碱、土的宁、马钱子总生物碱 HPLC 图

mg·L⁻¹与峰面积成良好的线性关系。

2.7 加样回收率与精密度 用PBS配制0.2,0.8,5 mg·L⁻¹的低、中、高3个浓度的土的宁和马钱子碱对照品溶液,1 d内分别进样测定5次,计算日内相对标准偏差,连续测定5 d,求算日间相对标准偏差,结果RSD均小于6%。同时分别测定马钱子碱和土的宁在低、中、高3个浓度下的加标回收率,见表1。结果表明,方法的准确度和精密度良好,符合生物样本分析方法的要求^[5]。

表1 马钱子碱和土的宁加样回收率(n=5)

成分	加入量 /mg·L ⁻¹	测定量 /mg·L ⁻¹	回收率 /%
马钱子碱	0.65	0.624 5 ± 0.000 9	96.07 ± 1.00
	1.30	1.310 5 ± 0.074 9	100.81 ± 0.92
	2.60	2.418 9 ± 0.099 9	93.03 ± 0.34
土的宁	1.17	1.193 7 ± 0.064 5	102.03 ± 1.07
	2.34	2.329 2 ± 0.093 2	99.54 ± 0.85
	4.68	4.556 2 ± 0.145 4	97.36 ± 0.62

2.8 血浆蛋白结合率试验 分别精密吸取马钱子碱对照品储备液适量于10 mL量瓶中,加pH 7.4磷酸盐缓冲液至刻度,分别得到质量浓度为10.4,26.0,52.0 mg·L⁻¹的马钱子碱PBS溶液。分别精密吸取土的宁对照品储备液适量于10 mL量瓶中,加pH 7.4磷酸盐缓冲液至刻度,分别得到质量浓度为18.72,



46.80, 93.60 mg · L⁻¹的士的宁 PBS 溶液。

总碱储备液三氯甲烷挥发后,甲醇复溶,分别精密吸取总碱甲醇液适量于5 mL量瓶中,加pH 7.4磷酸盐缓冲液至刻度,分别得到质量浓度为41.76, 104.4, 208.8 mg · L⁻¹的总碱 PBS 溶液,按2.4项下方法测定其中士的宁的质量浓度分别为18.80, 46.75, 93.47 mg · L⁻¹;其中马钱子碱的质量浓度分别为10.38, 25.76, 52.13 mg · L⁻¹。

分别精密吸取上述配制的3种浓度的马钱子碱 PBS 液、士的宁 PBS 液和总碱 PBS 液各30 μL于Ep-

endorf 离心管中,分别加入空白大鼠血浆570 μL,涡旋混合均匀1 min,置于37 °C水浴中温育4 h^[6],移取500 μL于截留相对分子质量为100 kPa的超滤管中,4 000 r · min⁻¹离心25 min,移取超滤液于截留分子量为10k的超滤管中,1万 r · min⁻¹离心10 min,取第二次超滤液50 μL注入高效液相色谱仪进行测定,代入标准曲线中计算超滤液中马钱子碱和士的宁的浓度,计算血浆蛋白结合率,见表2。

血浆蛋白结合率 = (药物总浓度 - 超滤液中药物浓度) / 药物总浓度 × 100%

表2 马钱子碱、士的宁、马钱子总生物碱在大鼠血浆中的蛋白结合率($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物	成分	药物总浓度/mg · L ⁻¹	超滤液中/mg · L ⁻¹	蛋白结合率/%
马钱子碱	马钱子碱	0.520	0.197 5 ± 0.017	65.60 ± 3.01
	总生物碱中马钱子碱	0.519	0.205 6 ± 0.002	62.19 ± 2.45
	马钱子碱	1.300	0.469 0 ± 0.117	68.20 ± 7.80
	总生物碱中马钱子碱	1.288	0.463 2 ± 0.089	69.55 ± 5.84
	马钱子碱	2.600	1.170 5 ± 0.109	59.58 ± 3.78
	总生物碱中马钱子碱	2.607	1.091 0 ± 0.105	61.76 ± 3.68
士的宁	士的宁	0.936	0.340 1 ± 0.063	66.17 ± 6.36
	总生物碱中士的宁	0.940	0.417 2 ± 0.035	54.79 ± 3.55 ¹⁾
	士的宁	2.340	0.781 0 ± 0.07 6	67.10 ± 2.52
	总生物碱中士的宁	2.338	1.126 6 ± 0.010	57.13 ± 4.49 ²⁾
	士的宁	4.680	2.106 2 ± 0.039	57.21 ± 0.79
	总生物碱中士的宁	4.674	2.069 0 ± 0.186	59.31 ± 3.65

注:总生物碱中士的宁组与同浓度单体士的宁组之间 *t* 检验;¹⁾ *P* < 0.05; ²⁾ *P* < 0.01。

从表2可见,单体马钱子碱、士的宁,马钱子总生物碱中马钱子碱和士的宁都具有中等强度的血浆蛋白结合率,在低、中、高3个血药质量浓度的蛋白结合率呈现非质量浓度依赖性,即未出现蛋白结合的饱和现象。马钱子总生物碱中马钱子碱的血浆蛋白结合率与同浓度单体马钱子碱的血浆蛋白结合率较为接近,而总碱中士的宁的蛋白结合率与同浓度单体士的宁相比,有较明显的下降,可能是因为总生物碱有效部位中各成分间产生血浆蛋白竞争性结合作用,马钱子碱与血浆蛋白结合力更强,士的宁游离型药物浓度增加,从而导致药效强度的显著改变。

3 讨论

血浆蛋白结合率的测定方法有平衡透析法、超滤法^[7]、超速离心法、微透析法等,前两种方法较为常用。平衡透析法所需要的透析平衡时间较长(通常,37 °C静置透析需要16~48 h达扩散平衡,低温下需要更长时间)^[8]。与平衡透析法相比,超滤法不仅设备简单,而且通常仅需离心十几分钟至数十分钟,即

可收集到足够供测定的血浆超滤液,适合于游离血药浓度测定,是测定游离血药浓度和药物血浆蛋白结合率可行的方法。本实验室曾采用平衡透析法测得马钱子碱在质量浓度为2.5, 1, 0.4 mg · L⁻¹时与大鼠血浆的蛋白结合率在59%左右^[9],此次采用超滤法的测定结果与之基本符合。*t* 检验表明,两种方法测得的蛋白结合率无显著性差异。

与药物结合的蛋白主要是白蛋白(相对分子质量65 000)、α₁-酸性糖蛋白(相对分子质量44 000)和脂蛋白(相对分子质量20万~340万)。考虑到单用截留相对分子质量为10 kDa的超滤管时超滤液浓度很低,可能因蛋白堵塞管壁,故依次使用截留相对分子质量为100 kDa和10 kDa的超滤管,进行2次超滤。

实验中采用37 °C为温育温度以模仿正常人体体温。经实验考察温育4 h,总碱与蛋白达到结合平衡。超滤时,应根据样品性质和需要收集的超滤液体积,确定超滤时间和速度。依据不漏蛋白,且超滤液体积与超滤前总体积之比以0.3~0.6为宜^[10]的



标准(避免蛋白质溶液因超滤而过分浓缩,引起药物与蛋白结合常数变化),最终确定初次超滤时蛋白质溶液经 $4\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 25 min,再次超滤时初滤液经 $1\ \text{万}\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。

药物的药理作用强度与血液中游离药物的浓度密切相关,也只有游离型的药物才能被生物转化或肾脏排泄。马钱子总生物碱中马钱子碱和土的宁母环结构相似,因此如果以这一整体的有效部位给药,可能出现血浆蛋白结合的竞争作用,互相竞争血浆蛋白的结合位点,表现为马钱子碱与血浆蛋白的结合更为牢固,土的宁的结合能力较弱,呈现“毒效俱显”的特点。本实验通过马钱子生物碱血浆蛋白结合率的测定与比较,能初步阐明马钱子以有效部位形式给药多成分协同作用的可能机制,及有效部位中其他生物碱类成分是否对两种主要有效成分的血浆蛋白结合率产生影响,有利于阐明马钱子给药后的体内过程和作用机制,为安全合理用药提供科学依据。

[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

$^{13}\text{C-NMR}$ 谱的数据分析[J]. 药学学报,1994,29(1):44.

- [2] Deng Xukun, Yin Wu, Li Weidong, 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, 106:179.
- [3] 蔡宝昌,何亚维,丁红芳,等. 马钱子不同炮制品中总生物碱的测定及急性毒性试验的比较[J]. 中国中药杂志,1994,19(10):598.
- [4] 中国药典. 一部[S]. 2005:34.
- [5] 箫参,陈坚行. 生物药剂分析方法的认证[J]. 中国药学杂志,1993,28:425.
- [6] 王长虹,王峥涛. 超滤法测定龙胆苦苷的血浆蛋白结合率[J]. 中国药学杂志,2005,40(3):232.
- [7] 姚志红,曹秀珍,邵萌,等. 超滤法测定甲基原薯蓣皂苷的血浆蛋白结合率[J]. 中国中药杂志,2008,33(11):1291.
- [8] 梁文权. 生物药剂学与药物动力学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2003:314,317.
- [9] 徐金华,陈军,蔡宝昌,等. 高效液相色谱法测定大鼠血浆中马钱子碱与血浆蛋白的结合率[J]. 中药新药与临床药理,2009,20(5):439.
- [10] 曾焯泽. 生物药物分析[M]. 2版. 北京:中国医药科技出版社,1998:243.

Determination and comparison of plasma protein binding rate of alkaloids from seed of *Strychnou nux-vomica*

WANG Xuan^{1,2}, HE Chaoqin¹, CHEN Ya¹, CHEN Jun^{1,2*}, CAI Baochang^{2*}

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

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

[Abstract] **Objective:** To determine the plasma protein binding rates of brucine and strychnine in total alkaloids from the seed of *Strychnou nux-vomica*, and make comparison with the single components at the same concentration. **Method:** Ultrafiltration was employed to determine the rat the plasma protein binding rate of the alkaloids from the seed of *S. nux-vomica*. The plasma concentrations were measured by RP-HPLC. **Result:** The protein binding rates of brucine were $(65.60 \pm 3.01)\%$, $(68.20 \pm 7.80)\%$, $(59.58 \pm 3.78)\%$ when the plasma concentrations was 0.520, 1.300, 2.600 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The protein binding rates of strychnine was $(66.17 \pm 6.36)\%$, $(67.10 \pm 2.52)\%$, $(57.21 \pm 0.79)\%$ when the plasma concentrations were 0.936, 2.340, 4.680 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively. As to the total alkaloids from the seed of *S. nux-vomica*, The protein binding rate of brucine was $(62.19 \pm 2.45)\%$, $(69.55 \pm 5.84)\%$, $(61.76 \pm 3.68)\%$ when the plasma concentrations were 0.519, 1.288, 2.607 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. And the protein binding rates of strychnine were $(54.79 \pm 3.55)\%$, $(57.13 \pm 4.49)\%$, $(59.31 \pm 3.65)\%$ when the plasma concentrations were 0.940, 2.338, 4.674 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** Brucine and strychnine have medium capacity in binding to plasma protein. In comparison with the single component of the same concentration, the protein binding rate of brucine in total alkaloids shows little difference, while there seems to be an obvious decrease for strychnine.

[Key words] brucine; strychnine; total alkaloids; plasma protein binding rate; ultrafiltration; HPLC

doi:10.4268/cjmm20110221

[责任编辑 王亚君]