

[制 剂]

## 马钱子总碱中2种成分的平衡溶解度、油水分配系数、体外透皮特性

王艳宏<sup>1</sup>, 齐笑<sup>1</sup>, 关枫<sup>1</sup>, 冯宇飞<sup>1</sup>, 李永吉<sup>1</sup>, 陈大忠<sup>2\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要:** 目的 考察马钱子 *Strychni Semen* 总碱中马钱子碱和土的宁的平衡溶解度、油水分配系数、体外透皮特性。方法 饱和溶解法测定2种成分在乙醇(10%、20%、30%、60%、90%、无水乙醇)、三氯甲烷、正辛醇、表面活性剂(0.5%吐温、0.5%去氧胆酸钠、0.5%油酸)中的平衡溶解度;摇瓶法测定两者在PBS(pH 2.5、4.0、5.0、5.8、6.8、7.0、7.4、9.0)中的油水分配系数;改良Franz扩散池法评价其在PBS、20%乙醇、无水乙醇中的体外透皮特性。**结果** 马钱子碱、土的宁均在三氯甲烷中的平衡溶解度最高,表面活性剂中最低;在体积分数大于20%的乙醇或pH小于8.0的PBS中,土的宁平衡溶解度高于马钱子碱,并分别在60%乙醇和pH 2.5 PBS中达到最高。2种成分油水分配系数相近,均随pH增加而升高,在pH9.0时最高。两者分别在无水乙醇、pH9.0 PBS中的累计透皮吸收率最高。**结论** 溶剂种类对马钱子碱和土的宁的平衡溶解度、油水分配系数、透皮吸收均有明显影响。本研究可为马钱子总碱经皮给药生物利用度的改善及相关制剂的开发提供参考。

**关键词:** 马钱子总碱;马钱子碱;土的宁;平衡溶解度;油水分配系数;体外透皮特性

中图分类号: R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)10-2034-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.10.009

## Equilibrium solubilities, oil-water partition coefficients and *in vitro* skin permeation features of two constituents in total alkaloids from *Strychni Semen*

WANG Yan-hong<sup>1</sup>, QI Xiao<sup>1</sup>, GUAN Feng<sup>1</sup>, FENG Yu-fei<sup>1</sup>, LI Yong-ji<sup>1</sup>, CHEN Da-zhong<sup>2\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**ABSTRACT: AIM** To investigate the equilibrium solubilities, oil-water partition coefficients and *in vitro* skin permeation features of brucine and strychnine in total alkaloids from *Strychni Semen*. **METHODS** Saturated dissolution method was applied to determining the equilibrium solubilities of two constituents in ethanol (10%, 20%, 30%, 60%, 90%, anhydrous ethanol), trichloromethane, n-octanol and surfactants (0.5% tween, 0.5% sodium deoxycholate, 0.5% oleic acid). Shake-flask method was adopted in detecting their oil-water partition coefficients in PBS (pH 2.5, 4.0, 5.0, 5.8, 6.8, 7.0, 7.4, 9.0). Modified Franz diffusion cell method was used for evaluating their *in vitro* skin permeation features in PBS, 20% ethanol and anhydrous ethanol. **RESULTS** Both brucine and strychnine showed the highest equilibrium solubilities in trichloromethane and the lowest equilibrium solubilities in surfactants. The equilibrium solubility of strychnine was higher than that of brucine in ethanol (>20%) or PBS (pH <8.0), which reached the highest in 60% ethanol and pH 2.5 PBS, respectively. The similar oil-water partition coefficients of two constituents, proportional to pH value, reached the highest at pH 9.0.

收稿日期: 2017-05-22

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81473359);黑龙江省科技厅青年基金项目(QC07C107);黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11531357)

**作者简介:** 王艳宏(1972—),女,博士,教授,硕士生导师,从事中药经皮给药、中药药性理论研究。Tel:(0451)87266893, E-mail:wang.yanhong@163.com

\* **通信作者:** 陈大忠(1970—),男,博士,研究员,硕士生导师,从事中药现代给药系统研究。Tel:(0451)87266893, E-mail:347471593@qq.com

And they exhibited the highest accumulated transdermal absorptivities in anhydrous ethanol and pH 9.0 PBS, respectively. **CONCLUSION** Solvent type has obvious effects on the equilibrium solubilities, oil-water partition coefficients and *in vitro* skin permeation features of both brucine and strychnine. This study can provide a reference for the bioavailability improvement of transdermal drug delivery and development of related preparations.

**KEY WORDS:** total alkaloids from *Strychni Semen*; brucine; strychnine; equilibrium solubilities; oil-water partition coefficients; *in vitro* skin permeation features

马钱子又名番木鳖,为马钱科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子,具有通络止痛、散结消肿之功效<sup>[1]</sup>,其有效成分为马钱子总碱,其中马钱子碱、土的宁含有量占总量的80%~90%<sup>[2-4]</sup>。由于马钱子毒性大、治疗窗窄、半衰期短,故经皮给药是其临床应用的较理想方式<sup>[5]</sup>。近年来,对其透皮给药的研究较多<sup>[6-11]</sup>,但对象大多为马钱子碱<sup>[12-13]</sup>,并且鲜有同时对马钱子碱和土的宁理化性质及透皮特性的报道<sup>[14]</sup>。因此,本实验将测定两者在不同体积分数乙醇、不同pH值磷酸盐缓冲液(PBS)、不同种类有机溶剂中的平衡溶解度,正辛醇-不同pH值PBS中的油水分配系数,以及其体外透皮速率和累积透皮量,以期为马钱子总碱经皮给药生物利用度的改善及相关制剂的开发提供参考。

### 1 仪器与试剂

AB265-S 分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);FA2004 分析天平(上海良单仪器仪表有限公司);HZS-HA 水浴振荡器(哈市东联电子技术开发有限公司);LC-20AD 色谱仪(日本岛津公司);DZTW 调温电热套(北京市永光明医疗仪器厂);TGL-16C 离心机(上海安亭科学仪器厂);HC-188 透皮仪(天津市矽新科技有限公司);MSE-1600 Franks 扩散池(天津市矽新科技有限公司);SB-5200 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

95%乙醇、冰乙酸、无水乙醇(天津市富宇精细化工有限公司);三乙胺、吐温-80(天津市博迪化工有限公司);色谱纯甲醇(美国Dikma公司);正辛醇、油酸(天津天力化学试剂股份有限公司);脱氧胆酸钠(北京奥博星生物技术有限责任公司)。

马钱子碱(批号B25064)、土的宁(批号B25079)对照品(中国食品药品检定研究院,含有量≥98%)。马钱子购自哈尔滨市盛泰中药饮片厂(批号20090165),由黑龙江中医药大学药学院孙慧峰教授鉴定为正品。

### 2 方法与结果

2.1 马钱子总碱提取物制备 取马钱子适量,6倍量50%乙醇(无水乙醇配制成为体积分数为50%,缓慢滴加浓盐酸,不断搅拌,调节pH至5)回流提取3次,每次2h,合并滤液,减压回收至无醇味,调节pH至10,三氯甲烷萃取4次,合并萃取液,减压回收至干,即得。

2.2 色谱条件 DIKMA Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相甲醇-水(24:76, 水:冰乙酸:三乙胺=100:1.04:0.15);体积流量1.0 mL/min;检测波长254 nm;柱温30℃。

2.3 对照品溶液制备 精密称取马钱子碱、土的宁对照品适量,三氯甲烷溶解并定容至10 mL量瓶中,制得每1 mL含马钱子碱100 μg、土的宁120 μg的溶液。

2.4 供试品溶液制备 精密称取马钱子总碱提取物适量,甲醇溶解并定容至10 mL,即得。

2.5 专属性考察 吸取对照品、供试品溶液各20 μL进行分析,色谱图见图1。由图可知,2种成分理论塔板数均大于7 000,分离度均大于1.5。

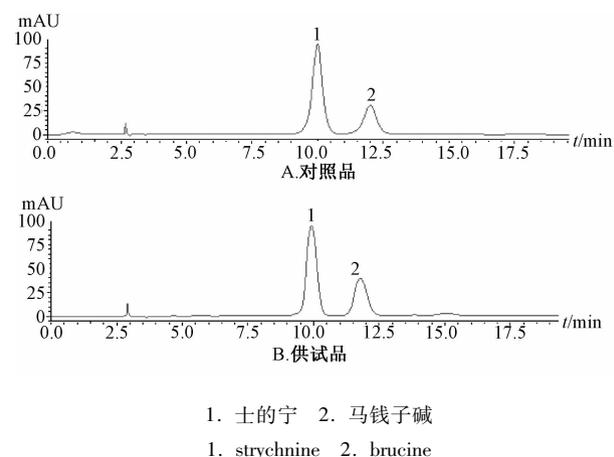


图1 各成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.6 线性关系考察 精密移取对照品溶液0.1、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、10.0 mL,置于10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。分别精密吸取

20  $\mu\text{L}$ 注入色谱仪,记录峰面积,以质量浓度为横坐标( $X$ ),峰面积为纵坐标( $Y$ )进行回归,得回归方程分别为马钱子碱  $Y = 11\,263X - 4\,195.8$  ( $r = 0.999\,7$ ),线性范围  $1.0 \sim 100.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ; 土的宁  $Y = 23\,070X + 11\,313$  ( $r = 0.999\,8$ ),线性范围  $1.0 \sim 120.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.7 平衡溶解度测定 取过量马钱子总碱提取物于5 mL具塞离心管中,分别加入乙醇(10%、20%、30%、60%、90%、无水乙醇)、PBS(pH 2.5、4.0、5.0、5.8、6.8、7.0、7.4、9.0)、有机溶剂(三氯甲烷、正辛醇、0.5%油酸;0.5%吐温80、0.5%去氧胆酸钠、无水乙醇),37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡24 h后,5 000 r/min离心15 min,取上清液,在“2.2”项下色谱条件下测定,记录峰面积。结果见图2~4。

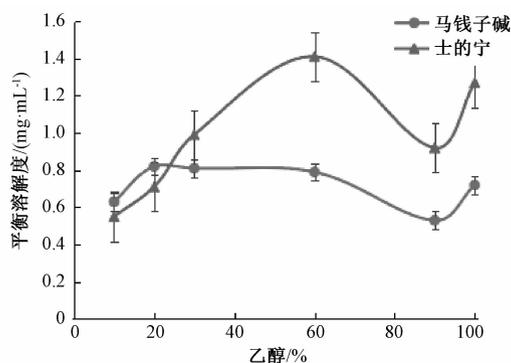


图2 2种成分在乙醇中的平衡溶解度

Fig. 2 Equilibrium solubilities of two constituents in ethanol

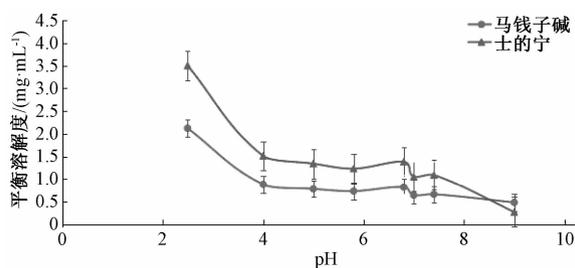


图3 2种成分在PBS中的平衡溶解度

Fig. 3 Equilibrium solubilities of two constituents in PBS

由图可知,马钱子碱、土的宁在不同溶剂中的平衡溶解度分别为  $0.48 \sim 9.04$ 、 $0.27 \sim 15.52 \text{ mg}/\text{mL}$ ,乙醇体积分数对两者影响的趋势类似,但对后者的影响程度高于前者,在60%时达到最大;当乙醇体积分数大于20%时,土的宁平衡溶解度高于马钱子碱。PBS pH值对两者影响的趋势也基本一致,均随pH增大而减小,对土的宁的影响也高于对马

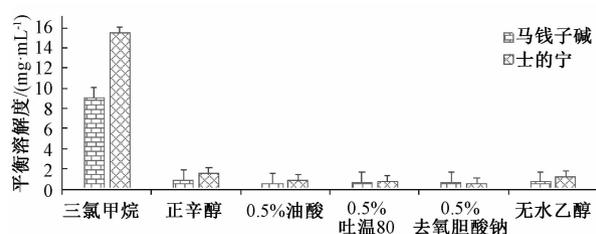


图4 2种成分在有机溶剂中的平衡溶解度

Fig. 4 Equilibrium solubilities of two constituents in organic solvents

钱子碱;在pH值小于8.0时,土的宁平衡溶解度高于马钱子碱。不同有机溶剂对两者的影响程度均依次为三氯甲烷>正辛醇>无水乙醇>表面活性剂(吐温、去氧胆酸钠和油酸);除了在0.5%去氧胆酸钠中马钱子碱平衡溶解度高于土的宁,其余溶剂中后者均高于前者。

2.8 油水分配系数测定 精密称取马钱子总碱提取物适量,置于25 mL量瓶中,正辛醇饱和的PBS溶液超声30 min溶解并定容至刻度,在“2.2”项色谱条件下测定,记录峰面积,得  $C_0$ 。再精密吸取10 mL置于锥形瓶中,加入等量PBS饱和的正辛醇,32  $^{\circ}\text{C}$ 下恒温振荡24 h,分取下层,在“2.2”项色谱条件下测定,记录峰面积,得  $C_{\text{水}}$ ,计算马钱子碱和土的宁在正辛醇、不同pH值PBS中的油水分配系数  $P$ ,公式为  $P = C_{\text{正辛醇}}/C_{\text{水}} = (C_0 - C_{\text{水}})/C_{\text{水}}$ ,结果见图5。由图可知,马钱子碱和土的宁油水分配系数的变化趋势基本一致,均随pH值增加而升高,而且非常相近,在pH 9.0时最高,分别为  $P_{\text{马钱子碱}} = 9.430$ 、 $P_{\text{土的宁}} = 9.431$ 。

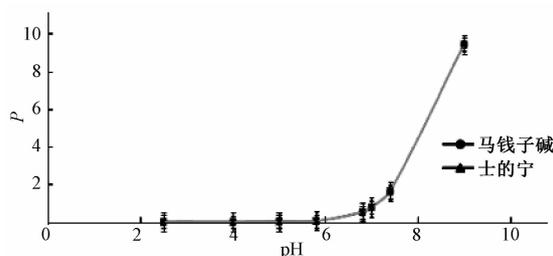


图5 2种成分在正辛醇和PBS中的油水分配系数

Fig. 5 Oil-water partition coefficients of two constituents in n-octanol and PBS

## 2.9 体外透皮实验

2.9.1 离体皮肤制备 大鼠处死后,机械脱毛,剪下背部皮肤,小心去除皮下组织和脂肪,浸泡于生理盐水中,备用。

2.9.2 供给液制备 精密称取马钱子总碱提取物

约 8.0 mg，置于 25 mL 量瓶中，加入 PBS 溶液、20% 乙醇、无水乙醇适量，溶解并稀释至刻度，即得。其中，马钱子碱、土的宁质量浓度分别为 0.127 4、0.323 6 mg/mL。

2.9.3 体外经皮吸收试验 将大鼠背部皮肤固定在改良的 Franz 扩散池上，有效扩散面积为 3.14 cm<sup>2</sup>，接收室体积为 5 mL，使皮肤表面面向供药室，皮肤里层与接受液刚好接触。供给室中加入供给液，接受液为含 20% 乙醇的生理盐水，水浴温度 32 ℃，转速 500 r/min，于 1、2、4、6、8、12 h 定时取样 5.0 mL（同时补充接受液 5.0 mL）。接受液在 50 ℃ 水浴中减压浓缩至干，1 mL 甲醇复

溶，作为供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下测定，记录峰面积。计算马钱子碱、土的宁的单位面积累积透过量  $Q$ ，公式为  $Q = (V \times C_n + V_0 \sum C_i) / A$ ，其中  $Q$  为单位面积累积透过量， $A$  为有效经皮吸收面积， $V$  为接受液体积， $V_0$  为取样体积， $C_n$  为第  $n$  个取样点所测接受液中的药物浓度， $C_i$  为第  $i$  ( $i \leq n - 1$ ) 个取样点所测接受液中的药物浓度。以不同时间点的  $Q$  对时间  $t$  作图，并进行线性回归，所得斜率即为透皮吸收速率  $J$ ，再计算累积透过率  $Q$ ，公式为  $Q = Q_{12h} \times A / Q_T$ ，其中  $Q_T$  为供给液中总药量， $Q_{12h}$  为 12 h 累积透过总量。结果见表 1、图 6~7。

表 1 不同溶剂对 2 种成分体外透皮吸收的影响

Tab. 1 Effects of different solvents on the *in vitro* transdermal absorption of two constituents

供给液	成分	回归方程	R <sup>2</sup>	J/(μg·h <sup>-1</sup> ·cm <sup>-2</sup> )	Q/%
pH2.5 PBS	马钱子碱	$Q = 0.8776t - 0.2164$	0.9999	0.8776	25.44
	土的宁	$Q = 1.3602t - 0.6562$	0.9978	1.3602	14.89
pH4.0 PBS	马钱子碱	$Q = 1.2344t - 0.7668$	0.9945	1.2344	33.79
	土的宁	$Q = 1.2739t - 0.5559$	0.9949	1.2739	14.75
pH5.0 PBS	马钱子碱	$Q = 1.3728t - 0.4011$	0.9993	1.3728	40.23
	土的宁	$Q = 1.5721t - 0.1812$	0.9980	1.5721	18.28
pH5.8 PBS	马钱子碱	$Q = 1.4398t - 0.5216$	0.9987	1.4398	41.11
	土的宁	$Q = 3.5380t - 1.2271$	0.9976	3.5380	39.61
pH6.8 PBS	马钱子碱	$Q = 1.6289t - 1.3029$	0.9922	1.6289	44.73
	土的宁	$Q = 5.0885t - 2.9425$	0.9955	5.0885	55.09
pH7.0 PBS	马钱子碱	$Q = 1.7621t - 0.4859$	0.9966	1.7621	52.15
	土的宁	$Q = 7.1276t - 6.3560$	0.9969	7.1276	86.25
pH7.4 PBS	马钱子碱	$Q = 1.9432t - 0.5652$	0.9988	1.9432	55.73
	土的宁	$Q = 7.6458t - 6.9743$	0.9973	7.6458	83.63
pH9.0 PBS	马钱子碱	$Q = 2.2529t + 0.2423$	0.9993	2.2529	67.54
	土的宁	$Q = 8.2020t - 7.0589$	0.9980	8.2020	88.98
20% 乙醇	马钱子碱	$Q = 2.8622t - 1.8539$	0.9886	2.8622	80.11
	土的宁	$Q = 6.1671t - 5.9104$	0.9747	6.1671	72.05
无水乙醇	马钱子碱	$Q = 3.0953t - 1.3743$	0.9933	3.0953	88.19
	土的宁	$Q = 8.0884t - 6.1814$	0.9970	8.0884	88.17

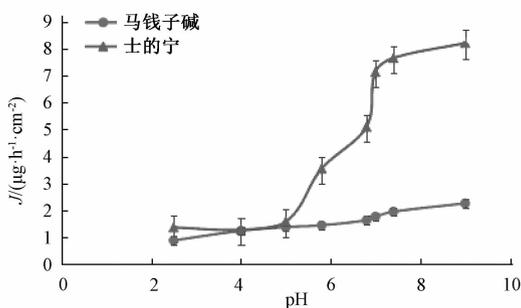


图 6 不同 pH 值对 2 种成分透皮吸收速率的影响

Fig. 6 Effects of different pH values on the transdermal absorption rates of two constituents

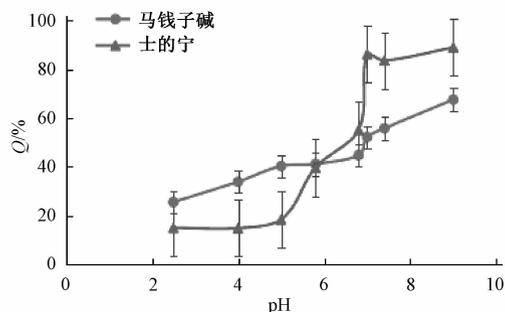


图 7 不同 pH 值对 2 种成分累积透过率的影响

Fig. 7 Effects of different pH values on the accumulative transmittance rates of two constituents

由此可知，溶剂种类对马钱子碱和土的宁透皮吸收速率和累计透过率的影响较大，两者变化趋势

基本一致，影响程度均依次为无水乙醇 > 20% 乙醇 > PBS，而且均随供给液 pH 增加而升高。其中，

当溶剂分别为无水乙醇和 pH9.0 PBS 时, 两者累计透皮吸收率最高, 并且前者变化程度较小, 后者变化程度较大。

### 3 讨论和结论

溶解度和油水分配系数是表征药物理化性质的重要参数<sup>[15-17]</sup>, 但目前对马钱子有效成分的相关测定大多局限在马钱子碱<sup>[18-19]</sup>。本实验结果表明, 溶剂种类对马钱子总碱中马钱子碱和土的宁平衡溶解度、油水分配系数、透皮吸收的影响均较大, 而且变化趋势基本一致; 两者油水分配系数相近, 但后者平衡溶解度和透皮吸收在总体上均高于前者; 两者体外透皮行为与油水分配系数、平衡溶解度均有较好的相关性。综上所述, 本实验可为马钱子总碱经皮给药生物利用度的改善及相关制剂的开发提供参考

### 参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 50

[2] 王 绚, 陈 军, 蔡宝昌. 马钱子体内分析研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 258-262.

[3] 方 芳, 陈海波, 马凤森, 等. 马钱子生物碱组分对类风湿性关节炎滑膜细胞增殖作用的比较研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2013, 37(1): 1-4.

[4] 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.

[5] 赵引利, 何燕宁, 杨宇杰, 等. 马钱子及其制剂药理学研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(11): 1710-1715.

[6] 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理学研究[J]. 中草药, 2010, 41(8): 1350-1352, 1379.

[7] 贺佳玉, 吴 丽, 王建春, 等. 马钱子碱新型壳聚糖纳米粒的体外抗肿瘤活性研究[J]. 药学学报, 2016, 51(4): 650-656.

[8] 王冬月, 陈 军, 蔡宝昌. 马钱子碱血药浓度测定方法的优化与应用[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(7): 1075-1078.

[9] 徐媛媛, 夏克春, 张 梅, 等. 马钱子碱经皮给药对乳腺癌种植瘤中 VEGF 和 COX-2 蛋白表达的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2012, 29(6): 529-532.

[10] 陈 军, 李 磊, 祁 艳, 等. 马钱子碱贴膏剂的制备与药物动力学研究[J]. 中药材, 2012, 35(8): 1295-1298.

[11] 夏克春, 张 梅, 李 平. 马钱子碱经皮给药对乳腺癌骨转移抑制机制的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(23): 1771-1775.

[12] 张贵华, 马云淑, 黄金娥, 等. 3 种挥发油对马钱子总碱透皮贴片体外经皮渗透的影响[J]. 中草药, 2012, 43(11): 2158-2163.

[13] 王 绚. 优化马钱子总生物碱的经皮给药制剂研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2012.

[14] 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): 1053-1057.

[15] 李 溯, 王 婷, 丁劲松. VBE-1 平衡溶解度和表观油水分配系数的测定及其酸碱稳定性的考察[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(19): 1641-1644.

[16] 施 洋, 孙 芸, 谢 莉, 等. 石榴皮中活性成分鞣花酸的平衡溶解度与油水分配系数的测定[J]. 新疆医科大学学报, 2016, 39(2): 145-148.

[17] 徐本亮, 王 冰, 浦益琼, 等. 丹皮酚平衡溶解度与油水分配系数测定及大鼠在体肠吸收研究[J]. 中成药, 2012, 34(10): 1892-1896.

[18] 祁 艳, 徐金华, 陈 军, 等. 不同 pH 值对马钱子碱油水分配系数和体外经皮吸收的影响[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(5): 993-995.

[19] 李 磊, 陈 军, 蔡宝昌, 等. pH 对马钱子碱经皮吸收性质与抗炎作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14): 1-3, 8.