



GC-FID 测定大鼠静脉注射新型醒脑静后龙脑的血药浓度及药动学研究

陆洋¹, 杜守颖^{1*}, 陈晓兰¹, 李鹏跃¹, 翟永松², 吴清¹, 李冬雪³

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102;

2. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069; 3. 中国生物技术发展中心, 北京 100039)

[摘要] 目的:建立大鼠血浆中龙脑浓度的 GC-FID 测定方法,探讨新型醒脑静静脉注射后龙脑在大鼠体内的药代动力学过程。方法:大鼠以 $10.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以艾片量计)剂量尾静脉注射新型醒脑静后,0.5,1,3,5,8,12,20,30,45 min 眼底采血,分离血浆,十八烷为内标,乙酸乙酯萃取,GC-FID 测定血浆中龙脑浓度,以 Kinetic 软件拟合药动学参数。结果:龙脑血药浓度在 $1.67 \sim 16.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好, $r=0.9996$,测得低、中、高浓度萃取回收率分别为 $(92.81 \pm 1.11)\%$, $(85.38 \pm 0.86)\%$, $(84.58 \pm 0.58)\%$;日内、日间精密度 RSD 均小于 3.0%。静脉注射新型醒脑静后,龙脑在大鼠体内药动学符合二室开放模型,主要药动学参数为 $t_{1/2\alpha} = (1.18 \pm 0.20) \text{ min}$, $t_{1/2\beta} = (22.27 \pm 6.85) \text{ min}$, $C_{\max(\text{Calc})} = (18.76 \pm 2.10) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MRT} = (23.84 \pm 7.67) \text{ min}^{-1}$, $\text{AUC} = (100.00 \pm 15.85) \text{ mg} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论:建立的 GC-FID 适用于龙脑血浆药物含量测定及药代动力学研究,新型醒脑静中龙脑在体内分布迅速,代谢较快。

[关键词] GC-FID;醒脑静;龙脑;血药浓度;二室模型

醒脑静注射液可清热泻火、凉血解毒、开窍醒脑,是临床用于治疗脑中风急性期的有效药物^[1]。本课题组已初步探讨了新型醒脑静中水溶性有效成分栀子苷的体内药动学过程^[2-3]。为了进一步研究新型醒脑静中挥发性成分的体内药动学,本实验通过改进血浆处理方法,建立了一步萃取法 GC-FID 测定龙脑血药浓度方法,简化了实验方法^[4],也克服了其他测定方法如 GC-MS^[4]对仪器要求较高的缺点,并用此法研究了新型醒脑静中龙脑在大鼠体内的药动学过程。

1 材料

Agilent 6890N 气相色谱仪;氢火焰离子检测器(FID)检测器;Agilent 工作站(美国 Agilent 公司);XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂);Anke TGL-16C 高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。

龙脑对照品(中国药物生物制品检定所,批号

110881-200706);十八烷(色谱纯,天津市光复精细化工研究所);乙酸乙酯(色谱纯,北京化工厂);醒脑静注射液(实验室自制,批号 20090311)。

雄性 SD 大鼠 6 只,体重 $(203 \pm 20) \text{ g}$,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2006-0009。

2 方法与结果

2.1 血浆样品中龙脑的 GC-FID 分析

Agilent-INNOWAX 气相毛细管色谱柱 $(0.53 \text{ mm} \times 30.0 \text{ m}, 1.0 \mu\text{m})$;氢火焰离子检测器(FID);氢气流量 $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温 $140 \text{ }^\circ\text{C}$;进样口及检测器温度 $250 \text{ }^\circ\text{C}$;氮气流速 $6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;分流比 1:1;进样量 $1 \mu\text{L}$ 。

2.2 血浆样品的处理方法

吸取含药大鼠血浆 $150 \mu\text{L}$ 至 1.5 mL 离心管中,加入 $75 \mu\text{L}$ 含内标 $(11.32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 十八烷)乙酸乙酯溶液,涡旋 60 s, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,吸取上清液 $25 \mu\text{L}$,进样 $1 \mu\text{L}$ 。

2.3 分析方法的验证

2.3.1 GC 分析方法的专属性 按 2.2 项下方法进行处理后测定。在上述色谱条件下,龙脑的保留时间为 6.29 min ,内标十八烷的保留时间为 8.00 min 。空白血浆以乙酸乙酯提取、空白血浆中加药以含内

[稿件编号] 20101113003

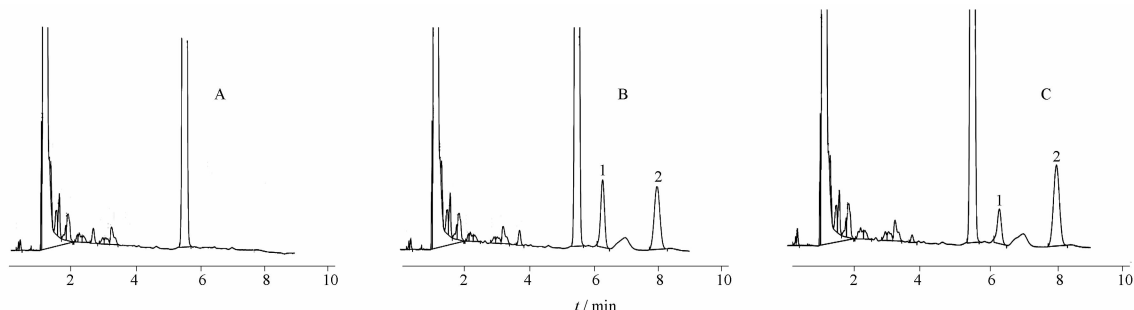
[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81073057);国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-008);教育部博士点基金(20090013110007);北京中医药大学自主选题项目(JYBZZ-JS021)

[通信作者] * 杜守颖,教授,博士生导师,研究方向中药新剂型与制剂关键技术研究, Tel: (010)84738615, E-mail: dushouying@263.net

[作者简介] 陆洋,博士,讲师,研究方向中药黏膜及经皮给药系统, E-mail: landocean28@163.com

标乙酸乙酯液提取及给药后大鼠血浆样品以含内标

乙酸乙酯液提取的气相色谱图见图1。



A. 空白血浆; B. 空白血浆中加龙脑对照品; C. 大鼠血浆样品; 1. 龙脑; 2. 十八烷。

图1 大鼠血浆中龙脑气相色谱图

2.3.2 标准曲线 精密称取龙脑对照品溶液,用甲醇稀释成 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液。取上述储备液,用甲醇分别稀释成 $25, 50, 100, 150, 200, 250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,各取 $10 \mu\text{L}$ 加入大鼠空白血浆 $140 \mu\text{L}$ 置于 1.5 mL 离心管中,涡旋混合 30 s ,按 2.2 项下方法处理,GC-FID 测定。以龙脑与十八烷峰面积比值 Y 对龙脑质量浓度 $X (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ 进行线性回归,回归方程为 $Y = 0.113X - 1.35 \times 10^{-3}$, $r = 0.9996$ 。血浆中龙脑在 $1.67 \sim 16.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好,最低检测质量浓度为 $0.17 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3.3 精密度试验 分别取血浆 $150 \mu\text{L}$,加入龙脑对照品储备液,配制含龙脑 $1.67, 6.67, 16.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血浆样品,按 2.2 项下方法处理,GC-FID 测定,进行方法的精密度试验 ($n = 5$)。低、中、高浓度日、内精密度 RSD 分别为 $2.1\%, 0.57\%, 0.38\%$ 。日间 RSD 分别为 $1.4\%, 0.71\%, 1.7\%$ 。

2.3.4 回收率试验 分别取血浆 $150 \mu\text{L}$,加入龙脑对照品储备液,配制含不同浓度龙脑的血浆样品,按 2.2 项下方法处理,结果见表 1。

表1 不同样品中龙脑的回收率 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

血样质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	方法回收率 $\%$	萃取回收率 $\%$
1.67	103.6 ± 1.23	92.81 ± 1.11
6.67	101.8 ± 1.02	85.38 ± 0.86
16.67	98.76 ± 0.28	84.58 ± 0.24

2.4 大鼠药代动力学试验

雄性 SD 大鼠 6 只,以 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以艾片计) 剂量经尾静脉注射自制新型醒脑静注射液。给药后

不同时间 ($0.5, 1, 3, 5, 8, 12, 20, 30, 45 \text{ min}$) 眼底取血 0.4 mL ,肝素抗凝, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 高速离心后取血浆 $150 \mu\text{L}$,同 2.2 项下操作,测定,代入标准曲线计算不同时间龙脑血药浓度。平均血药浓度经时曲线见图 2。

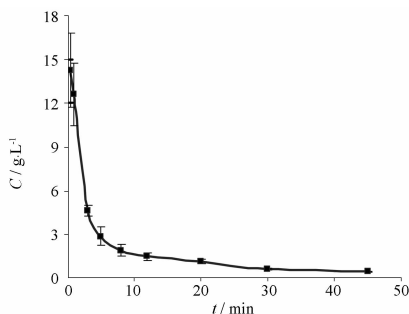


图2 SD 大鼠静注醒脑静注射液后龙脑平均血药浓度经时曲线 ($n = 6$)

2.5 药动力学数据计算

龙脑血药浓度经时数据用 Kinetic 药动力学软件拟合,拟合方法选择房室模型,结果表明,大鼠尾静脉注射醒脑静后,龙脑体内药动力学过程符合二室开放模型,主要药动力学参数见表 2。

3 讨论

由于动物血浆中龙脑的浓度较低,以 GC-FID 进行测定时,先用有机溶剂萃取龙脑,再吹干浓集^[4]。此方法虽能提高检测灵敏度,但由于龙脑易挥发,回收率较低,操作过程也较为繁琐。本实验以少量乙酸乙酯对血浆中龙脑进行萃取离心后进样,萃取回收率可达 85% 。但本实验方法在萃取过程中通常会发生乳化,上清液的吸取有一定难度,因



表2 主要药动学参数($\bar{x} \pm s, n = 6$)

药动学参数	数值	药动学参数	数值
A/mg · L ⁻¹	16.38 ± 2.88	C _{max(Calc)} /mg · L ⁻¹	18.76 ± 2.97
α	0.60 ± 0.085	Kel/min ⁻¹	0.19 ± 0.024
B/mg · L ⁻¹	2.38 ± 0.65	K ₁₂ /min ⁻¹	0.34 ± 0.078
β	0.033 ± 0.0090	K ₂₁ /min ⁻¹	0.11 ± 0.025
AUC/μg · min · mL ⁻¹	100.00 ± 15.85	t _{1/2α} /min	1.18 ± 0.20
MRT/min	23.84 ± 7.67	t _{1/2β} /min	22.27 ± 6.85

此对实验人员的操作能力要求较高。由于本实验中血样为萃取后直接测定,为进一步提高方法的灵敏度,采用了分流比的进样模式。此外,文献中常使用萘作为龙脑气相测定的内标物,但萘具有一定的毒性,因此本实验选择了更为安全的十八烷作为内标。

本实验对6只大鼠尾静脉注射了自制的新型醒脑静注射液,给药后龙脑体内分布符合二室开放模型。这与文献[5]报道结论接近。新型醒脑静注射液后,龙脑的t_{1/2α}约为1 min,说明其在体内的分布极快,作为高脂溶性物质,推测其主要向脂肪、脑组织分布。此外,龙脑在体内消除较快,平均滞留时间(MRT)约为25 min,说明其可维持有效血药浓度的时间较短,临床可能需要频繁给药。因此,深入研究其

他给药途径,如口服、黏膜给药,对于开发更为高效、长效、方便、安全的新型醒脑静制剂具有积极的意义。

[参考文献]

- [1] 王晓琴, 吴潇. 醒脑静注射液治疗中风痰热内闭证临床观察[J]. 湖北中医杂志, 2009, 31(7): 39.
- [2] 姚宗玲, 陆洋, 杜守颖, 等. 醒脑静滴鼻液中栀子苷的家兔体内药动学研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(14): 1871.
- [3] Yang L, Chen X, Du S, et al. The *in situ* and *in vivo* study on enhancing effect of borneol in nasal absorption of geniposide in rats [J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(5): 691.
- [4] 李华龙, 陆榕, 赵丽霞, 等. GC/MS方法测定人血浆中龙脑药物含量的方法学研究[J]. 药物评价研究, 2009, 32(1): 43.
- [5] 宋洪涛, 郭涛, 张晓红, 等. 毛细管气相色谱法测定人体血浆中冰片的血药浓度[J]. 解放军药学报, 2003, 19(1): 12.

Study on pharmacokinetics of borneol in rats injected with novel-Xingnaojing by GC-FID

LU Yang¹, DU Shouying^{1*}, CHEN Xiaolan¹, LI Pengyue¹, ZHAI Yongsong², WU Qing¹, LI Dongxue³

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2. Capital Medical University, Beijing 100069, China; 3. China National Center for Biotechnology Development, Beijing 100039, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a GC-FID method for the determination of borneol concentration in rat plasma and to investigate the pharmacokinetics after injection of novel-Xingnaojing. **Method:** Novel-Xingnaojing was injected via by caudal vein injection. The blood samples were collected by posterior orbital venous plexus approach at 0. 5, 1, 3, 5, 8, 12, 20, 30, 45 min. The drug in plasma was extracted with ethyl acetate and then detected by GC-FID, octadecane was used as the internal standard. The pharmacokinetic parameters were calculated by the software of Kinetica. **Result:** The calibration curve was good linear in the range of 1. 67-16. 67 mg · L⁻¹. The extraction recoveries of low, medium and high concentration were (92. 81 ± 1. 11)%, (85. 38 ± 0. 86)% and (84. 58 ± 0. 58)%, respectively. And the RSDs of within-day and between-day were below 3. 00%. Plasma concentration of borneol was consistent with the two-compartment open model. The pharmacokinetic parameters were that the t_{1/2α} was (1. 18 ± 0. 20) min, the t_{1/2β} was (22. 27 ± 6. 85) min, the C_{max(Calc)} was (18. 76 ± 2. 10) mg · L⁻¹, the MRT was (23. 84 ± 7. 67) min⁻¹, and the AUC was (100. 00 ± 15. 85) mg · min · L⁻¹. **Conclusion:** The GC-FID method developed can be applied to determination and pharmacokinetics. The borneol in novel-Xingnaojing is distributed and metabolized fast after being administrated.

[Key words] GC-FID; Xingnaojing; borneol; plasma concentration; two-compartment model

doi:10.4268/cjcmm20111610

[责任编辑 马超一]