

清咽滴丸大鼠体内药代动力学研究

徐雪芳¹, 何新^{1,2,3*}

1 天津中医药大学 中药学院, 天津 300193;

2 教育部方剂学重点实验室, 天津 300193;

3 天津市中药化学与分析重点实验室, 天津 300193

摘要 目的: 冰片和薄荷脑是清咽滴丸中主要挥发性有效成分。本研究拟建立大鼠 ig 清咽滴丸后血浆中龙脑和薄荷脑同时测定的气相色谱分析方法, 阐明清咽滴丸中龙脑、薄荷脑大鼠体内药代动力学特征。**方法:** 血浆样品采用内标法并经液-液萃取处理, 同时采用氢火焰离子化检测器 (FID) 检测龙脑和薄荷脑大鼠体内的血药浓度。**结果:** 本法可同时测定龙脑、薄荷脑的大鼠血浆浓度, 并采用 DAS (Version 1.0) 软件拟合药代动力学参数, 结果表明龙脑和薄荷脑均符合开放性一室模型。龙脑在 2.5~50.0 ng/ μ L ($r=0.996\ 3$), 薄荷脑在 8.7~62.2 ng/ μ L ($r=0.999\ 4$) 均具有良好的线性关系, 最低定量限分别为 2.4、5.0 ng/ μ L。**结论:** 建立了灵敏、简便、准确的气相色谱法, 该方法适用于清咽滴丸中冰片和薄荷脑体内药代动力学研究, 为清咽滴丸制剂的临床合理用药提供了理论依据。

关键词 清咽滴丸; 冰片; 薄荷脑; 药代动力学; 气相色谱法

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2010) 02-0106-04

In vivo pharmacokinetic study on Qingyan Drop Pills in rat

XU Xue-fang¹, HE Xin^{1,2,3*}

1 College of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2 Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medical Formulae, Ministry of Education, Tianjin 300193, China

3 Tianjin Key Laboratory of TCM Chemistry and Analysis, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective: Borneol and menthol are both main active substances of Qingyan Drop Pills. To establish a method for simultaneous determination of borneol and menthol in plasma of rats after ig administration of Qingyan Drop Pills by gas chromatography. **Methods:** The blood sample was carried out by liquid-liquid extraction (LLE) with an internal standard solution in naphthalene. Borneol and menthol were determined by means of flame ionization detection (FID). **Results:** The pharmacokinetic parameters were estimated by a compartmental method using the DAS software program (Version 1.0). The standard curves were linear over a wide concentration range of 2.5 - 50.0 ng/ μ L ($r=0.996\ 3$), 8.7 - 62.2 ng/ μ L ($r=0.999\ 4$) for both borneol and menthol in plasma, respectively. The limit of quantification (LOQ) of borneol and menthol in plasma was 2.4 and 5.0 ng/ μ L, respectively. **Conclusion:** This validated assay method has been successfully applied to a pharmacokinetic study of borneol and menthol in plasma of rats after ig administration of Qingyan Drop Pills. The pharmacokinetic parameters provide some information for clinical administration of Qingyan Drop Pills.

Key words: Qingyan Drop Pills; borneol; menthol; pharmacokinetic; gas chromatography (GC)

中药滴丸剂是近年来在中药丸剂基础上发展起来的一种新剂型, 本研究选取的清咽滴丸是一种经典的用于治疗各类急、慢性咽喉炎症的滴丸型中成药制剂, 具有剂量小、起效快等特点。其采用牛黄、青黛、薄荷、冰片、诃子、甘草等纯中药提取物,

利用超临界提取、固体分散等先进技术制成, 具有散火、解毒、化腐、利咽等功效, 并对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌等有很强的抗菌作用^[1,2]。作为其中主要挥发性成分冰片, 其是一种天然存在的单萜类化合物, 已有研究表明冰片能增加某些药物体内作

收稿日期: 2010-02-28

基金项目: 国家自然科学基金 (项目编号: 30772778)、国家科技支撑计划 (项目编号: 2007BAI47B04)。

作者简介: 徐雪芳 (1985—), 女, 辽宁省, 硕士研究生, 药物分析学。Tel: 15822881076, E-mail: fangfang.1985616@yahoo.com.cn

* 通讯作者 何新, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药代动力学研究。Tel: (022) 23055511, Email: hexintn@yahoo.com

用效果,改善药物跨膜通透性,提高药物在脑组织的分布^[3,4]。现代药理研究表明^[5],冰片具有抗菌、抗炎等活性。薄荷脑是一种单帖醇,天然存在于多种精油中,研究表明,薄荷脑具有抗炎、止痛等功效,还具有其它止咳作用。目前,含有薄荷脑的药物已广泛的应用由感冒所引起的炎症中^[6-7]。虽然冰片和薄荷脑广泛应用于中药复方制剂中,并且已建立了冰片及薄荷脑各自的体内定量测定的分析方法^[8-11],例如 GC-MSⁿ, GC-MSD, GC-FID。但是,目前为止,对于复方制剂中冰片和薄荷脑同时测定的体内药代动力学的研究仍未见报道。因此,本研究旨在建立一种血浆样品中冰片和薄荷脑同时测定的气相色谱法,应用该方法研究大鼠灌服清咽滴丸后体内冰片和薄荷脑药代动力学特征,为该药物的临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 仪器

Agilent 6890N 气相色谱仪 (FID 检测器,美国安捷伦公司);台式高速离心机 (AllegraTM 64R Centrifuge, Beckman);分析天平 (Mettler Toledo, AX-205);超声机 (KQ-250B 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司);WH-3 微型涡旋混合仪 (上海沪西分析仪器厂有限公司);氮吹仪 (型号 MTN-2800D, 天津市奥特塞恩斯仪器有限公司)

1.2 试药

清咽滴丸 (天津中新药业第六中药厂提供,批准文号: (93) 卫药准字 Z-33 号,规格: 50 粒;批号: 602750;标示量: 冰片 0.43 mg/丸, 3.04 mg/丸)、冰片 (中国药品生物制品检定所,质量分数 $\geq 98\%$,批号: 110743-200504)、薄荷脑 (中国药品生物制品检定所,质量分数 $\geq 98\%$,批号: 0728-200005)、萘 (内标物,质量分数 $\geq 98\%$)、醋酸乙酯、正己烷 (色谱纯,天津江天化学科技有限公司)、二氯甲烷 (分析纯,天津江天化学科技有限公司);实验动物: 大鼠 (雄性), 体质量 230~250 g (中国医学科学院放射医学研究所)

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱: HP-1 毛细管色谱柱 (30.0 m $\times$ 250 μ m $\times$ 0.25 μ m);柱温: 110 $^{\circ}$ C;汽化室、检测器温度: 250 $^{\circ}$ C (样品运行 13 min 后,转入后运行程序,并升温至 200 $^{\circ}$ C,持续 6 min);载气: 氮气;体积流

量: 2.5 mL/min;氢气: 40 mL/min;空气体积流量: 450 mL/min;尾吹气氮气: 30 mL/min;进样量: 1 μ L。

2.2 对照溶液的配制

精密称取冰片、薄荷脑对照品 6.25、12.5 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,用正己烷-二氯甲烷 (9:1) 的混合溶剂溶解,制备成质量浓度为 0.625、1.255 mg/mL 的贮备液。

2.3 内标溶液的配制

精密称取萘对照品,置于 10 mL 量瓶中,用正己烷-二氯甲烷 (9:1) 的混合溶剂溶解,制备成质量浓度为 95 ng/ μ L 的内标溶液。

2.4 给药与血样的采集

取雄性大鼠 6 只,体质量 230~250 g,给药前禁食 10 h,试验过程中大鼠均可自由饮水。将 30 粒清咽滴丸溶解于 10 mL 蒸馏水中,ig 体积为 1 mL/100 g。分别于给药前后 0、5、10、20、30、35、50、60、90、120 min 从大鼠眼眶取血约 0.4 mL,置肝素化的离心管中,3 000 r/min,离心 10 min,分离血浆,于 -20 $^{\circ}$ C 保存至分析测定。

2.5 血浆样品处理与测定

取含药血浆 150 μ L,置于 1.5 mL 离心管中,分别加入 20 μ L 饱和 NaCl 和 28 μ L 质量浓度为 95 ng/ μ L 的内标溶液涡旋 30 s 后,加入正己烷-二氯甲烷 (9:1) 的混合溶剂 550 μ L,涡旋震荡 5 min,12 000 r/min 离心 10 min,移取上清液于 30 $^{\circ}$ C 氮气流下吹干。残余物以 100 μ L 正己烷-二氯甲烷 (9:1) 的混合溶剂复溶后,12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液,进样,进样体积 1 μ L。

2.6 数据分析

$T_{\max}$, $C_{\max}$ 为实测值,其余药代动力学参数均采用 DAS ver1.0 软件进行数据拟合所获得。

3 结果

3.1 方法专属性考察

取大鼠空白血浆、空白血浆添加样品及大鼠 ig 清咽滴丸后实际血样,按“2.5”项下处理并分析,结果见图 1,可见龙脑、薄荷脑与内标及血浆样品中的内源性物质可达到良好的基线分离,并且峰形良好。

3.2 标准曲线的制备

取大鼠空白血浆 150 μ L,加入一定量的龙脑和薄荷脑的混合溶液,配制含龙脑、薄荷脑质量浓度分别为 2.5、8.8、12.5、17.5、22.5、37.5、50 ng/

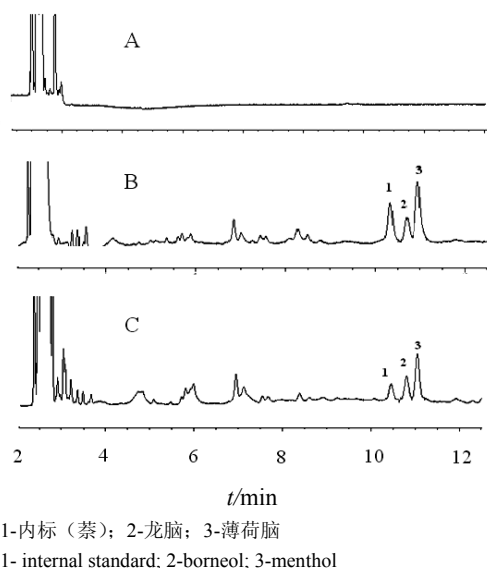


图1 空白血浆(A)、对照品(B)和血浆样品(C)色谱图
Fig.1 Typical chromatograms of blank plasma (A), standard plasma sample (B), plasma sample after ig administration of Qingyan Drop Pills (C).

μL ; 8.7、12.4、14.9、17.4、22.4、37.3、62.2 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的血浆样品溶液,按“2.5”项下处理。分别以血浆样品中龙脑及薄荷脑的质量浓度为横坐标,龙脑、薄荷脑与内标物(萘)的峰面积之比为纵坐标绘制标准曲线,龙脑的标准曲线方程为 $Y = 24.69C_1 + 0.1554$ ($r = 0.9963$),在2.5~50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 内具有良好的线性关系,薄荷脑标准曲线方程为 $Y = 20.34C_2 + 0.0078$ ($r = 0.9994$),在8.7~62.2 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 具有良好的线性关系。

3.3 精密度试验

取大鼠空白血浆 150 μL ,按照“2.5”项下方法配制低、中、高 3 个质量浓度的质量控制样品,龙脑分别为 3.5、15.5、50.0 $\text{ng}/\mu\text{L}$;薄荷脑分别为 8.7、17.4、62.6 $\text{ng}/\mu\text{L}$,每一质量浓度平行进样 3 次,RSD 均小于 10%,可见方法准确、可靠。

3.4 灵敏度试验

龙脑和薄荷脑的最低检测限分别为 0.86、1.4 $\text{ng}/\mu\text{L}$;信号和噪音的比值分别为 2.8、3.2;其定量限分别为 2.4、5.0 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

3.5 提取回收率试验

取大鼠空白血浆 150 μL ,按照“2.5”项下方法平行配制低、中、高 3 个浓度的质量控制样品各 3 份,同时将相同浓度下的对照品溶液直接进样;将经过提取所得的色谱峰面积与标准溶液直接进样的

色谱峰面积比较,计算样品的提取回收率,结果表明龙脑血浆样品的提取回收率在 77.4%~86.7%,薄荷脑血浆样品的提取回收率在 72.1%~88.6%,可见该提取方法稳定、可靠。

3.6 龙脑和薄荷脑体内药代动力学研究

大鼠 ig 清咽滴丸后,龙脑和薄荷脑体内药时曲线见图 2,从图 2 中可以看出龙脑和薄荷脑的体内吸收快,分别于短时间内可达到最大的血药浓度,龙脑于 20 min 达到最大的血药浓度,为 18.9 $\text{ng}/\mu\text{L}$;薄荷脑于 25 min 左右可达到最大的血药浓度,为 79.02 $\text{ng}/\mu\text{L}$,最大血药浓度及达峰时间均采用实测值,其它参数运用 DAS (Ver1.0) 软件进行拟合,结果见表 3。

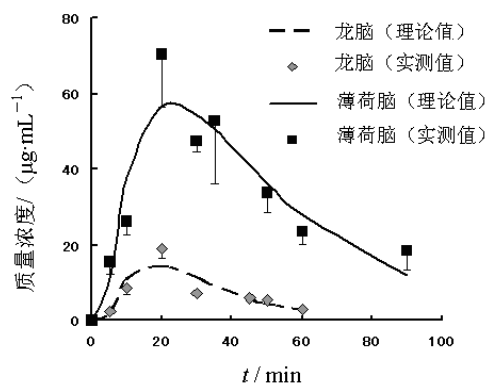


图2 大鼠 ig 清咽滴丸后龙脑和薄荷脑药时曲线 ($n=5$)

Fig.2 Mean plasma concentration-time profiles of borneol and menthol in plasma of rat after ig administration of Qingyan Drop Pills ($n=5$)

4 讨论

清咽滴丸是治疗咽喉疾病的一经典滴丸型中成药制剂,其中主要有效挥发性成分龙脑和薄荷脑的同时体内药动力学研究尚未见报道,因此阐明中药制剂中主要有效成分的体内过程对于指导临床合理用药具有重要意义。

本研究采用健康动物模型,应用常用血药浓度法^[12-13]研究大鼠 ig 清咽滴丸后血浆中龙脑、薄荷脑的药动力学特征。由于滴丸制剂载药量小,所以建立一种快速、灵敏、简便的气相色谱法对于中药多组份生物样品的含量测定尤为重要。本文应用建立的气相色谱法测定龙脑和薄荷脑的体内的量,探讨其在大鼠体内的动态变化规律。从药时曲线(图2),及药代动力学参数(表3)中可知血浆中龙脑、薄荷脑体内药时过程均符合开放性一室模型,分别于

表3 大鼠 ig 清咽滴丸后龙脑和薄荷脑体内药动学参数 (n=5)

Table 3 Pharmacokinetic parameters of plasma in rats after ig administration of Qingyan Dropping Pills (n=5)

参 数	单 位	数 值	
		龙脑	薄荷脑
$T_{1/2\alpha}$	min	10.8±1.3	23.06±1.2
$AUC_{0-\infty}$	mg·L ⁻¹ ·min	494.3±0.3	3235±224.6
V_d/F	L	1.05±0.15	3.92±0.31
CL/F	L·min ⁻¹	0.068±0.02	0.118±0.03
C_{max}	ng·μL ⁻¹	18.97±2.7	79.02±11.4
T_{max}	min	20.0±0	25.0±4.4
k_e	min ⁻¹	0.065±0.023	0.03±0.001
k_a	min ⁻¹	0.09±0.005	0.08±0.006

20、25 min 可达到最大血药浓度 (C_{max})。从药物血浆半衰期 ($t_{1/2}$) 及消除速率常数 (k_e) 可知冰片、薄荷脑在体内吸收快、消除快, 分别于 ig 清咽滴丸 1 h 和 1.5 h 后便无法检测, 此快吸收、快消除的特性不仅与药物本身的理化性质有关, 而且又与滴丸类制剂释药快的特性相符。

样品处理方法对于生物样品的分析测定起着至关重要的作用, 当采用液-液萃取的方式对样品进行处理时, 溶剂的选择尤为重要, 若选取的有机溶剂挥发性差, 可能会使待测的挥发性成分长时间处于挥干状态, 从而导致含量降低。因此本文选取正己烷-二氯甲烷 (9:1) 的混合溶剂作为溶剂系统, 因其具有挥发性好、萃取能力强的特性, 使得提取回收率高。此外, 由于滴丸制剂载药量小, 为了减少药物在处理过程中的损失, 因此在可控温度下操作是必要的。为了提高生物样品测定的可靠性, 本试验采取内标法, 内标物为蔡。

本研究所建立的快速、灵敏、简便的气相色谱法可同时测定清咽滴丸中主要有效成分冰片和薄荷脑的大鼠血浆含量, 同时阐明了冰片和薄荷脑在大鼠体内的动态变化规律, 为临床合理用药提供依据。

参考文献

[1] 詹可顺, 魏 伟, 余南生. 清咽滴丸治疗慢性咽炎的临床研究[J]. 中国基层医药, 2003, 10 (11): 1129-1130

[2] Iscan G, Kirimer N, Kurkuoglu M, *et al.* Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils [J]. *Agric Food Chem*, 2002, 50:3943-3946.

[3] Xiao Y Y, Ping Q N, Chen Z P. The enhancing effect of synthetical borneol on the absorption of tetramethylpyra-

zine phosphate in mouse [J]. *Int J Pharm*, 2007, 337: 74-79.

[4] Cai Z, Hou SX, Li YB, *et al.* Effect of borneol on the distribution of gastrodin to the brain in mice via oral administration [J]. *J Drug Target*, 2008, 16:174-184.

[5] Song X P, Qu L J, MI H Q, *et al.* Analgesic and Anti-inflammation Effect of borneol [J]. *Trad Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2007, 18: 353-355.

[6] 梁呈元, 李维林, 张涵庆, 等. 薄荷脑化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2003, 22: 9-12.

[7] Gelal A, Jacob P, Yu L, *et al.* Disposition kinetics and effects of menthol [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1999, 66:128-135.

[8] Xiao Y Y, Ping Q N, Chen Z P. A simple gas chromatographic method for the simultaneous determination and pharmacokinetic study of tetramethylpyrazine phosphate and borneol in mouse plasma and brain tissue after oral administration of the Fufang Tetramethylpyrazine Phosphate Tablets [J]. *J Chromatogr Sci*, 2008, 46: 395-400.

[9] 俞 滢, 王 玮, 李士敏. GC-MSⁿ 同时测定小鼠血浆中冰片和尼莫地平质量浓度[J]. 中国药学杂志, 2006, 41:1259-1261.

[10] 吴 红, 郭 军, 李晓晔, 等. 气相色谱法测定健康人含服速效救心丸后冰片的血药浓度[J]. 临床药学, 2003, 14: 414-415.

[11] 郭 军, 黄 熙, 王骊丽, 等. GC-FID 法同步测定人含服速效救心丸后血中冰片、川芎嗪含量[J]. 中草药, 2003, 34: 730-732.

[12] 冯彬彬, 张建海, 徐晓玉, 等. 中药复方药代动力学研究进展[J]. 中草药, 2009, 40:77-79.

[13] 韩 玲. 多成分中药药代动力学研究的现状及思考[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(21): 2442-2448.