

不同剂量冰片对栀子苷在大鼠脑内浓度的影响

董小平^{1,2}, 阮鸣³, 喻斌¹, 金路^{1,2}, 朱冬清^{1,2}, 方泰惠^{1,2*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046

2. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 江苏 南京 210046

3. 南京晓庄学院药用菌物研究所, 江苏 南京 211171

摘要: 目的 研究大鼠 ig 不同剂量冰片后对栀子苷在大鼠脑内浓度的影响。方法 大鼠 ig 给予冰片 0.05、0.1、0.2、0.4 g/kg 15 min 后, 尾 iv 栀子苷 300 mg/kg, 于栀子苷给药后 0.5、1、5、10、15、30、45、60、90 min 采血、取脑, HPLC 法测定血样和脑组织样本中栀子苷的量, 采用 3P97 软件计算栀子苷在血浆和脑组织中的药动学参数, 计算栀子苷在血浆和脑组织中的相对生物利用度和脑靶相关参数。结果 栀子苷在血浆和脑组织分布符合二室开放模型, 经冰片处理后可提高栀子苷在脑组织中的 $C_{\max}$ 和 AUC, 延长 MRT, 缩短 $t_{\max}$, 其中冰片 0.2 g/kg 剂量对栀子苷的影响最显著。结论 大鼠 ig 冰片后 iv 栀子苷, 冰片可提高栀子苷入脑量和入脑速度, 以冰片 0.2 g/kg 剂量对栀子苷的影响最显著。

关键词: 冰片; 栀子苷; 药动学; 脑靶; 生物利用度

中图分类号: R969.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)07-1366-05

Effects of borneol at different doses on concentration of geniposide in rat brains

DONG Xiao-ping^{1,2}, RUAN Ming³, YU Bin¹, JIN Lu^{1,2}, ZHU Dong-qing^{1,2}, FANG Tai-hui^{1,2}

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

2. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing 210046, China

3. Institute of Medicinal Fungi, Nanjing Xiaozhuang College, Nanjing 211171, China

Abstract: Objective To study the concentration of geniposide in brains of rats ig administrated with borneol at different doses. **Methods** Rats were ig administrated with 0.05, 0.1, 0.2, and 0.4 g/kg of borneol, and then iv injected with 300 mg/kg of geniposide. After 0.5, 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, and 90 min of geniposide injection, blood and brain tissue were collected, and the concentration of geniposide in the plasma and brain tissue was detected by RP-HPLC. The pharmacokinetic parameters of geniposide in plasma and brain tissue were analyzed by 3P97 software, and the relative bioavailability and brain target-correlated parameters of geniposide were calculated. **Results** Pharmacokinetics of geniposide in plasma and brain tissue was accorded with two-compartment model. After treated with borneol, $C_{\max}$ and AUC of geniposide in brain tissue were increased, MRT was prolonged, and $t_{\max}$ was shortened. Besides, borneol with dose of 0.2 g/kg had the most significant effect. **Conclusion** Borneol could increase the quantity and velocity of geniposide permeating the blood-brain barrier and the effect will be most obvious when the dose of borneol is 0.2 g/kg.

Key words: borneol; geniposide; pharmacokinetics; brain target; bioavailability

冰片为芳香开窍类中药, 许多中成药如苏合香丸、安宫牛黄丸、冰硼散, 都含有冰片。现代药理学研究表明, 冰片因提高药物的生物利用度而提高药物疗效^[1-3], 冰片不仅极易透过血脑屏障, 还能促进其他药物如甲氨蝶呤、尼莫司汀、庆大霉素透过血脑屏障^[4-7]。然而给大鼠 ig 冰片的剂量差异较大,

有的给药剂量为 0.3 g/kg, 有的为 1.95 g/kg^[8-9]。因此研究和确定冰片的最佳安全剂量对其“引药上行”功效的发挥和组方用药的安全性保障十分必要。栀子苷是治疗脑缺血的复方舒络粉针中的主要成分, 本实验给大鼠 ig 不同剂量冰片后 iv 栀子苷, 研究冰片对大鼠脑内栀子苷浓度的影响, 以期冰片临

收稿日期: 2011-11-14

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81001651)

作者简介: 董小平 (1986—), 安徽安庆人, 硕士研究生, 研究方向为心脑血管药理。

*通讯作者 方泰惠 Tel: (025)86798155 E-mail: fangtaihui@sina.com

床合理、准确用药提供依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

冰片(经南京中医药大学中药鉴定教研室朱德康教授鉴定为合成冰片),购自南京市药材公司,批号 20100802; 栀子苷粉末(质量分数为 90%),潮州市泽润制药有限公司,批号 20101112; 栀子苷对照品,中国药品生物制品检定所,批号 201035。

1.2 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪,包括 G1379A 在线脱气机、G1311A 四元梯度泵、G1313A 自动进样器、G1314AVWD 可变波长紫外检测器、Agilent 1100 色谱工作站; XHF—D 高速分散器,宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 动物

雌性 SD 大鼠,清洁级,购于南京中医药大学实验动物中心,许可证号 SYXK(苏)2007-0030。

2 方法

2.1 分组与给药

SD 大鼠 225 只随机分为 5 组(每组 45 只): 对照组,冰片 0.05、0.1、0.2、0.4 g/kg 组。4 个给药组 ig 不同剂量冰片(15%冰片石蜡溶液)15 min 后,尾 iv 栀子苷 300 mg/kg(0.1%栀子苷生理盐水溶液),对照组仅 iv 栀子苷,不给冰片,iv 速率为 0.1 mL/s。各组动物在给予栀子苷后 0.5、1、5、10、15、30、45、60、90 min 眼眶取血 1.5 mL,置于肝素化离心管中,离心取血浆;实验末处死大鼠,取脑,剔除脑部大血管,称质量。

2.2 栀子苷的 HPLC 测定

2.2.1 色谱条件 Hedera ODS-3 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(35:65),柱温 30 ℃,检测波长 238 nm,体积流量为 1.0 mL/min,进样量为 10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取栀子苷对照品以甲醇为溶剂,配成含栀子苷 5.2 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 血浆样本和脑样品预处理 取血浆 0.3 mL,加入甲醇 1 mL,涡流 1 min,16 000 r/min 离心 10 min,取上清液,40 ℃氮气流下吹干,残留物溶于 500 μL 流动相中,涡流 1 min,离心后取上清液 10 μL 进样。

按脑组织(g)与生理盐水(mL)的比例为 2:3 进行匀浆,取 1 mL 脑匀浆,加入甲醇 3 mL,涡流 1 min,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,40 ℃氮气流下吹干,残留物溶于 500 μL 流动相中,涡流 1 min,16 000 r/min 离心 10 min 后取上清液 10 μL 进样,按“2.2.1”项下色谱条件测定。

2.2.4 方法学考察

(1) 专属性试验:取大鼠空白血浆、脑匀浆,分别加入栀子苷对照品,按“2.2.3”项下操作测定栀子苷对照品、含栀子苷对照品的空白血浆、脑匀浆及大鼠 iv 栀子苷后的血浆、脑匀浆样品,观察其他成分对栀子苷的干扰。结果显示,测定不受内源性杂质峰干扰,在该色谱条件下峰形良好,栀子苷的保留时间为 7.84 min。结果见图 1。

(2) 标准曲线的绘制:取 7 份大鼠空白血浆

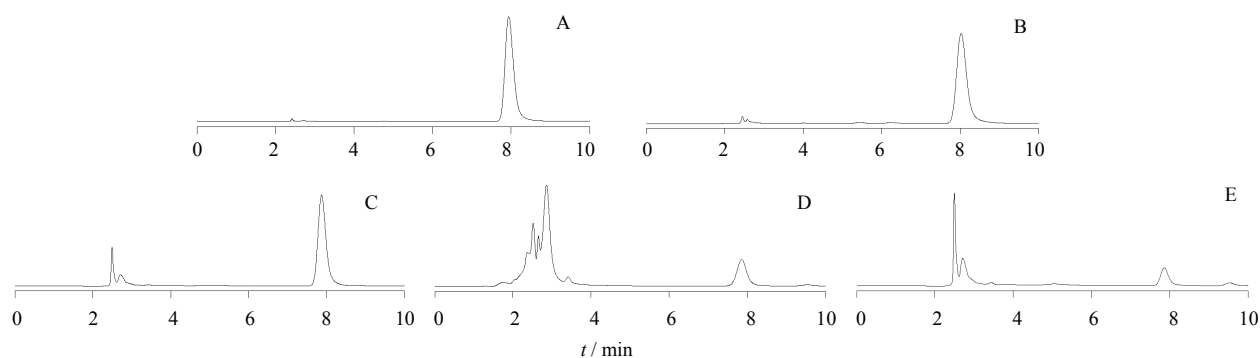


图 1 栀子苷对照品 (A)、空白血浆+栀子苷对照品 (B)、空白脑组织匀浆+栀子苷对照品 (C)、注射栀子苷后血浆样品 (D) 和脑组织样品 (E) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of geniposide reference substance (A), blank plasma + geniposide reference substance (B), blank brain tissue homogenate + geniposide reference substance (C), plasma sample after ig administration of geniposide (D), and brain tissue sample (E)

0.3 mL, 加入不同质量浓度的栀子苷对照品, 配制成质量浓度分别为 1.4、0.7、0.35、0.175、0.087 5、0.016 15、0.008 075 mg/mL 的血浆样品溶液, 按照“2.2.3”项下方法操作。以血浆中栀子苷质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线。

取空白大鼠脑匀浆 1 mL, 加入不同质量浓度的栀子苷对照品, 配制成质量浓度分别为 0.106、0.053、0.026 5、0.013 25、0.006 625、0.003 313、0.001 657 mg/mL 的脑匀浆样品溶液, 按照“2.2.3”项下方法操作。以脑匀浆中栀子苷质量浓度 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线。结果栀子苷在血浆中质量浓度为 0.008 075~1.4 mg/mL 呈良好线性关系, 回归方程为 $Y=16\,631X-209.36$ ($r=0.999\,8$); 栀子苷在脑组织中质量浓度为 0.001 657~0.106 mg/mL, 呈良好线性关系, 回归方程为 $Y=19\,923X-37.752$ ($r=0.999\,7$)。

(3) 回收率试验: 参照标准曲线与定量范围, 用空白血浆配制质量浓度分别为 0.7、0.175、0.016 15 mg/mL 的栀子苷对照品血浆溶液, 同法用空白脑匀浆配制 0.053、0.013 25、0.003 313 mg/mL 的对照品脑匀浆溶液。以上样品每种浓度取 5 份, 按“2.2.3”项下方法处理, 分别测定栀子苷的峰面积, 由标准曲线计算得实测量, 以实测量与加入量之比计算方法回收率。对照品血浆溶液中栀子苷的回收率分别为 98.1%、101.3%、97.5%; 对照品脑匀浆溶液中栀子苷的回收率分别为 99.6%、100.3%、102.1%。

(4) 精密度试验: 按回收率方法配制相同质量浓度的栀子对照品血浆和脑匀浆溶液。在 1 d 内 0、2、4、6、12、24 h 不同时间点连续进样 3 次, 计算日内精密度, 在 5 d 内进样, 计算日间精密度。结果对照品血浆栀子苷日间精密度分别为 3.30%、3.345%、4.52%; 对照品脑组织匀浆中栀子苷的日内精密度分别为 2.28%、2.54%、3.89%, 日间精密度分别为 3.32%、4.49%、1.79%。

(5) 稳定性试验: 0.7、0.175、0.016 15 mg/mL 3 种不同质量浓度的栀子苷对照品血浆 ($n=5$) 和 0.053、0.013 25、0.003 313 mg/mL 3 种不同质量浓度的栀子苷对照品脑匀浆 ($n=5$) 在室温 (20 °C) 放置 24 h、-20 °C 冰冻 24 h 以及反复冻融 3 次后, 栀子苷回收率均在 94%~103%, 表明栀子苷在这 3 种状态下稳定。

2.3 数据处理

数据处理与药动学特点分析采用所有时间点血

药浓度和脑药浓度测定值, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并绘制血药浓度-时间曲线和脑药浓度-时间曲线。大鼠血药浓度-时间曲线用 3P97 软件进行处理, 选择拟和优度值 (goodness of fit) 最小者为最佳权重, 再比较该权重下不同房室模型的 AIC 值, AIC 值最小者为最佳房室模型, 求出药动学参数。 $C_{\max}$ 和 $t_{\max}$ 直接由血药浓度值和脑药浓度值获取。按下列公式计算各组血浆和脑组织的相对生物利用度 (F) 以及冰片的药物靶向指数 (DTI) [7]。

$$F = AUC_{\text{干预组}} / AUC_{\text{空白组}}$$

$$DTI = (AUC_{\text{干预组-脑}} / AUC_{\text{干预组-血}}) / (AUC_{\text{空白组-脑}} / AUC_{\text{空白组-血}})$$

3 结果

以 HPLC 法测定血浆和脑匀浆中栀子苷, 绘制血药浓度-时间曲线和脑药浓度-时间曲线, 结果发现栀子苷在血浆中和脑匀浆中的药动学均符合二室开放模型, $W=1$ 。其血药和脑药浓度-时间曲线见图 2 和 3。药动学参数见表 1 和 2, 脑靶参数见表 3。

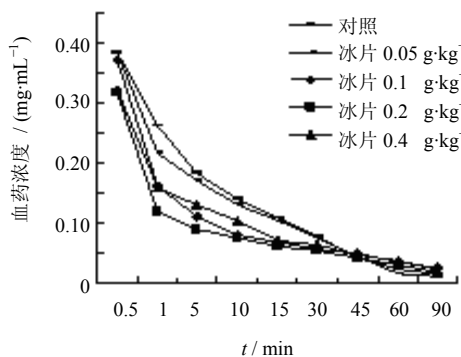


图2 栀子苷血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 2 Concentration-time curves of geniposide in plasma ($\bar{x} \pm s, n=5$)

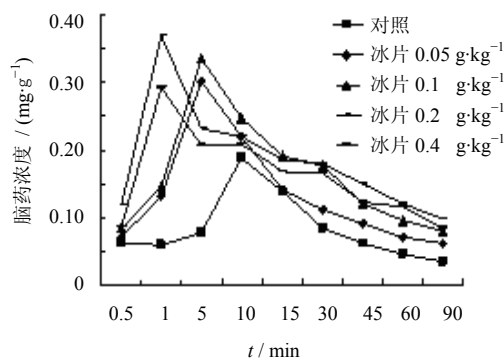


图3 栀子苷在脑药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 3 Concentration-time curves of geniposide in brain tissue homogenate ($\bar{x} \pm s, n=5$)

表 1 冰片对大鼠血浆中栀子苷药动学参数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 1 Effect of borneol on pharmacokinetic parameters of geniposide in plasma of rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

参 数	单 位	对 照	冰片 / (g·kg ⁻¹)			
			0.05	0.1	0.2	0.4
A	mg·mL ⁻¹	0.306±0.110	0.760±0.392*	1.170±0.280*	1.674±0.520*	5.722±1.510*
α	min ⁻¹	1.380±0.470	3.085±0.911*	2.943±1.150*	4.020±1.150*	4.910±1.060*
B	mg·mL ⁻¹	0.196±0.033	0.190±0.060	0.104±0.039*	0.092±0.038*	0.125±0.034*
β	min ⁻¹	0.033±0.019	0.034±0.010	0.017±0.003	0.018±0.003	0.021±0.016
V(c)	mL·kg ⁻¹	599.368±102.900	319.370±27.500*	235.687±31.750*	169.070±35.340*	51.210±10.610*
$t_{1/2\alpha}$	min	0.506±0.025	0.224±0.044*	0.233±0.0845*	0.172±0.049*	0.141±0.029*
$t_{1/2\beta}$	min	21.618±4.280	20.400±1.310	40.204±9.927*	38.706±7.040*	33.054±15.260
k ₂₁	min ⁻¹	0.556±0.190	0.660±0.082	0.256±0.107*	0.227±0.080*	0.121±0.039*
k ₁₀	min ⁻¹	0.079±0.108	0.160±0.065*	0.200±0.036*	0.032±0.010*	0.825±0.213*
k ₁₂	min ⁻¹	0.780±0.076	2.310±1.130*	2.507±0.440*	3.494±1.227*	3.996±1.110*
CL(s)	mL·kg ⁻¹ ·min ⁻¹	47.494±21.070	51.441±24.270	47.136±9.420	54.028±13.360	42.438±15.560
AUC _{0-∞}	mg·mL ⁻¹ ·min	6.779±1.490	5.900±1.390	6.810±0.706	5.360±1.920	6.836±3.540
AUMC _{0-∞}		238.400±103.300	170.450±69.330	465.840±112.620*	289.230±124.910	377.430±54.490*
MRT	min	35.450±8.440	28.850±6.310	67.590±20.300*	53.980±15.880*	55.210±6.20*
C _{max}	mg·mL ⁻¹	0.380±0.141	0.053±0.028*	0.510±0.0540	0.500±0.042	0.500±0.150

与对照组比较: * $P < 0.05$, 下表同* $P < 0.05$ vs control group, same as below表 2 冰片对大鼠脑组织匀浆中栀子苷药动学参数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 2 Effect of borneol on pharmacokinetic parameters of geniposide in brain tissue homogenate of rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

参 数	单 位	对 照	冰片 / (g·kg ⁻¹)			
			0.05	0.1	0.2	0.4
A	mg·mL ⁻¹	0.038±0.013	0.205±0.097	0.084±0.025*	0.031±0.014	-0.024±0.301
α	min ⁻¹	0.065±0.012	0.316±0.049*	0.077±0.032	0.069 1±0.026	3.703±0.97*
B	mg·mL ⁻¹	0.007±0.003	0.016±0.003*	0.011±0.013	0.015±0.004*	0.026±0.015*
β	min ⁻¹	0.013±0.007	0.012±0.008	0.004±0.003	0.007±0.003	0.012±0.014
$T_{1/2\alpha}$	min	10.743±4.800	2.190±0.412*	8.960±2.810	10.030±2.840	0.190±0.038*
$T_{1/2\beta}$	min	59.620±15.000	58.264±20.960	163.760±52.037*	104.059±26.440*	55.684±26.260
k ₂₁	min ⁻¹	0.025±0.008	0.085±0.039*	0.019±0.006	0.035±0.037	0.001±0.001*
k ₁₀	min ⁻¹	0.030±0.006	0.044±0.015	174.000±48.200*	0.013±0.013*	32.515±18.600*
k ₁₂	min ⁻¹	0.021±0.007	0.199±0.134*	0.045±0.025	0.027±0.018	-28.801±20.010*
CL(s)	mL·kg ⁻¹ ·min ⁻¹	334.750±121.240	207.900±68.590	94.977±17.780*	126.345±45.210*	284.643±163.530
C _{max}	mg·mL ⁻¹	0.019±0.004	0.031±0.005*	0.033±0.015	0.037±0.015*	0.029±0.005*
AUC _{0-∞}	mg·mL ⁻¹ ·min	0.810±0.330	1.550±0.760	1.880±0.270*	2.410±0.860*	1.990±0.417*
AUMC _{0-∞}		47.827±16.360	144.100±37.560*	147.830±30.040*	246.600±191.820*	181.900±75.220*
MRT	min	58.860±16.650	92.700±49.100	78.450±5.920*	102.760±102.870	91.400±32.500

4 讨论

血脑屏障的开放情况虽然可采用伊文思蓝染色进行观察, 但该方法缺乏灵敏性和精确性, 与临床

吻合度低。通过 HPLC 法直接观察药物的入脑量, 接近临床实际情况, 同时也增加了检测的准确性和灵敏度^[10]。本实验建立的血浆和脑组织栀子苷检测方法专

表3 冰片对脑靶参数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)
Table 3 Effect of borneol on brain target parameters ($\bar{x} \pm s, n=5$)

冰片剂量 / (g·kg ⁻¹)	$F_{\text{血浆}}$	$F_{\text{脑组织}}$	DTI
0.05	0.898±0.248	2.000±0.920	2.480±1.520
0.1	1.052±0.284	2.560±0.860	2.620±1.140
0.2	0.820±0.330	3.210±1.120	4.620±2.570
0.4	1.019±0.470	2.594±0.515	3.250±2.360

属性强、数据可靠, 适合生物样品的测定要求。

在预实验中, 采用甲醇、乙腈、高氯酸等除蛋白方法对血浆样本和脑组织样本进行处理, 结果表明甲醇除蛋白简易、快捷、彻底, 故采用甲醇。实验结果表明, 4种剂量的冰片对栀子苷在血浆中的 $C_{\max}$ 、MRT 和 AUC 均无显著影响, 但与对照组比较, 冰片 0.2 g/kg 组的 V(c) 显著减少, CL 显著提高, 提示冰片可能对药物在血浆中的分布和消除有一定影响。对脑组织中栀子苷药动学检测结果显示, 冰片各剂量组的 CL 低于对照组, 而 AUC_{0-∞} 和 MRT 均大于对照组, 表明冰片可增加栀子苷的入脑量和在脑内的滞留时间; 冰片各剂量组 $C_{\max}$ 也显著高于对照组, 进一步提示冰片对栀子苷入脑速度具有促进作用。对冰片 4 个剂量组效果比较发现, 冰片 0.2 g/kg 组 AUC_{0-∞} 和 $C_{\max}$ 的增加较冰片其他剂量组更加显著。冰片 0.1 g/kg 组能显著提高 MRT, 也对提高 $C_{\max}$ 有较强作用, 但不管是对 AUC_{0-∞} 还是 AUMC_{0-∞} 的作用都不及冰片 0.2 g/kg 组。冰片 0.4 g/kg 组 CL (s) 最大, 这可能是该组 AUC_{0-∞}、AUMC_{0-∞} 以及 MRT 降低的原因之一。本实验得到的冰片开放血脑屏障的最佳给药剂量, 为后期构建微透析-UPLC-MS 技术平台、获取脑内药动学参数及用相关分子生物学技术研究冰片对 ATP 结合盒超家族转运蛋白/mRNA 表达的影响等提供了依据, 也为冰片临床安全用药提供了参考。

脑靶参数检测结果表明, 冰片对栀子苷的血浆 F 似乎未见明显影响, 但可显著提高 (19%~29%) 脑组织中栀子苷的 F , 提高其 DTI (21%~37%), 比较冰片 4 个剂量的效果, 可见冰片 0.2 g/kg 剂量

组的效果最明显, 提示大鼠 ig 冰片 0.2 g/kg 时对血脑屏障的开放作用最为显著。

参考文献

- [1] Wu S R, Chen G G, He Y X, *et al.* Studies on the effects of borneol on the distribution of rifampicin in mice [J]. *Chin Pharm J*, 2004, 39(4): 289-291.
- [2] 陈瑞玲. 冰片对丙戊酸钠透过血脑屏障的影响 [J]. 中国康复理论与实践, 2007, 13(2): 151-153.
- [3] 吴雪, 欧阳丽娜, 向大位, 等. 冰片及石菖蒲促进羟基红花黄色素 A 透过血脑屏障的实验研究 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 734-737.
- [4] 高晨, 高旻, 史卫忠, 等. 冰片对甲氨蝶呤透过血脑屏障影响的实验研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2009, 25(2): 134-137.
- [5] 史卫忠, 赵志刚. 冰片作用下尼莫司汀透过血脑屏障的药动学 [J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(22): 1933-1936.
- [6] 刘启德, 梁美蓉, 陈芝喜, 等. 冰片对庆大霉素透血脑屏障的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 1994, 11(1): 37-40.
- [7] 陈新梅, 朱家璧, 孙卫东, 等. 吸收促进剂对人参皂苷 Rg1 鼻腔吸收的促进作用及鼻腔毒性 [J]. 药学学报, 2006, 41(2): 149-155.
- [8] 董先智, 汤小爱, 高秋华, 等. 冰片对顺铂透血脑屏障促进作用的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(4): 275-277.
- [9] 葛朝莉, 韩漫夫, 白润涛, 等. 冰片促进血脑屏障开放的超微结构研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2008, 6(10): 1183-1185.
- [10] Yu B, Ruan M, Sun Y, *et al.* Effect of borneol and electroacupuncture on the distribution of hyperforin in the rat brain [J]. *Neural Regen Res*, 2011, 6(24): 1876-1882.