

小鼠静脉注射醒脑静注射液后栀子苷的脑药浓度及药动学研究

温 然, 赵雪姣, 李慧云, 杨 冰, 程艳珂, 陆 洋*, 杜守颖*

北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘要: 目的 建立小鼠 iv 醒脑静注射液后测定脑内栀子苷浓度的 HPLC 法, 探讨醒脑静注射液中栀子苷在小鼠体内的药动学过程。方法 40 只小鼠尾 iv 醒脑静注射液 10.9 mg/kg (以栀子苷计) 后, 分别于 1、3、5、10、30、60、90、120 min 摘眼球放血后脱颈椎处死 5 只小鼠, 迅速分离出小鼠全脑, 制成脑匀浆, HPLC 测定脑匀浆中栀子苷的量, 以 Kinetica 软件拟合药动学参数, 拟合方法选择非房室模型。结果 栀子苷脑药浓度在 54~1 620 ng/g 时线性关系良好, $r=0.999 1$; 栀子苷脑药浓度在 216、864、1 620 ng/g 时萃取回收率分别为 $(102.60 \pm 4.28)\%$ 、 $(102.16 \pm 4.48)\%$ 、 $(97.66 \pm 3.25)\%$; 日内、日间精密度的相对标准偏差 (RSD) 均小于 4.10%。小鼠 iv 醒脑静注射液后, 主要药动学参数 C_{\max} 为 $(1 246.0 \pm 520.7)$ ng/g, t_{\max} 为 1 min, MRT 为 (50.5 ± 1.9) min, AUC 为 $(35 780.3 \pm 6 148.0)$ ng/(min·g)。结论 该方法简便、快速、重复性好, 适用于小鼠栀子苷脑药浓度测定及药动学研究。

关键词: 醒脑静注射液; 栀子苷; 脑药浓度; 药动学; 高效液相色谱; 非房室模型

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)18-2573-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.18.016

Study on brain drug concentration of geniposide in mice after iv injected with Xingnaojing Injection and its pharmacokinetics

WEN Ran, ZHAO Xue-jiao, LI Hui-yun, YANG Bing, CHENG Yan-ke, LU Yang, DU Shou-ying

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: Objective To develop an HPLC method for the determination of geniposide concentration in mouse brain and to investigate the pharmacokinetics after iv injection of Xingnaojing Injection. **Methods** Forty mice were iv injected with Xingnaojing Injection 18 mg/kg (by geniposide), and the brain samples were collected at 1, 3, 5, 10, 30, 60, 90, 120 min after eyeball bleeding and 5 mice were sacrificed by cervical dislocation. The whole brain of mice was separated quickly to prepare brain homogenates, and the concentration of geniposide was detected by HPLC. The pharmacokinetic parameters were calculated by the software of Kinetica and the fitting method was noncompartmental. **Results** The calibration curve was in good linear in the range of 54—1 620 ng/g, $r=0.999 1$. The extraction recoveries of geniposide brain drug concentration at 216, 864, and 1 620 ng/g were $(102.60 \pm 4.28)\%$, $(102.16 \pm 4.48)\%$, and $(97.66 \pm 3.25)\%$, respectively. And the RSD values of inter- and intra-day were below 4.10%. The pharmacokinetic parameters were that the C_{\max} was $(1 246.0 \pm 520.7)$ ng/g, the t_{\max} was 1 min, the MRT was (50.5 ± 1.9) min, and the AUC was $(35 780.3 \pm 6 148.0)$ ng/(g·min). **Conclusion** The HPLC method for determining geniposide concentration in brain is simple, rapid, sensitive, and suitable for pharmacokinetic studies.

Key words: Xingnaojing Injection; geniposide; brain drug concentration; pharmacokinetics; HPLC; noncompartmental model

醒脑静注射液是临床上用于治疗脑中风急性期的中药制剂, 但原处方中栀子的水溶性成分保留较少。研究发现, 栀子的水溶性成分如栀子苷, 也具

有抗脑缺血损伤的作用^[1], 临床上广泛用于缺血性脑血管病的治疗。因此本实验将原醒脑静处方中的栀子水溶性成分予以保留, 制成新型醒脑静制剂(以

收稿日期: 2013-01-21

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81102816); 国家自然科学基金面上项目 (81073057); 北京中医药大学创新团队发展计划 (2011-CXTD-13)

作者简介: 温 然, 女, 研究方向为中药新制剂与新技术。E-mail: wenran_bucm@163.com

*通信作者 陆 洋 E-mail: landocean28@163.com

杜守颖 Tel: (010)84738615 E-mail: dushouying@263.net

下简称醒脑静注射液)。前期研究表明, 栀子苷血药浓度达峰时间 (t_{\max}) 约 1 min, 在血中消除较快, 平均滞留时间 (MRT) 约 11 min^[2-3]。为进一步研究栀子苷的药动学规律, 为醒脑静注射液合理用药提供药动学依据, 本实验建立测定小鼠脑匀浆中栀子苷量的 HPLC 法^[4], 并采用甲醇沉淀蛋白, 研究醒脑静注射液中栀子苷在小鼠脑内的药动学过程。

1 材料

1.1 仪器与试剂

醒脑静注射液, 自制 (栀子苷质量浓度为 2.2 mg/mL), 批号 20100221; 栀子苷对照品, 质量分数为 99.7%, 中国药品生物制品检定所, 批号 110749-200714; 乙腈、甲醇, 色谱纯, 美国 Merck 公司; 其余试剂均为分析纯; 纯净水。

1.2 动物

ICR 小鼠, 雄性, 体质量 20~25 g, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证号 SCXK (京) 2006-0009。

1.3 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪 (包括紫外检测器), 日本岛津公司; METTLER-AE240 型电子分析天平; VDRTEX-5 旋涡混合器, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; Anke TGL-16G 高速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 DiamonsilTMC₁₈ 柱 (250 mm×4.6

mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (14:86); 检测波长 238 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温为室温, 等度洗脱。

2.2 给药

取小鼠 40 只, 尾 iv 醒脑静注射液 10.9 mg/kg (以栀子苷计)。实验前 12 h 禁食, 自由饮水。

2.3 样品采集与处理

于给药后 1、3、5、10、30、60、90、120 min, 小鼠摘眼球放血后脱颈椎处死, 迅速分离出全脑, 小心吸干全脑上残留血液, 称质量, 按 1.5 mL/g 的比例加入生理盐水匀浆, 匀浆 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液 300 μL, 加入 600 μL 甲醇沉淀蛋白, 涡旋混合器振荡 60 s, 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液 850 μL, 60 °C 水浴, 空气吹干, 加入 100 μL 甲醇振荡 30 s, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 20 μL 进样。

2.4 对照品溶液的制备

精密称取栀子苷对照品 54.00 mg, 置 5 mL 量瓶中, 乙腈溶解并稀释至刻度, 得质量浓度为 10.9 mg/mL 的储备液。精密吸取 1 mL 上述储备液, 置于 10 mL 量瓶中, 乙腈稀释至刻度, 得质量浓度为 1.08 mg/mL 的对照品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性试验 样品按“2.3”项下方法处理, 按“2.1”项下色谱条件测定。结果栀子苷的保留时间为 11.3 min。小鼠空白脑匀浆的内源性物质对栀子苷的测定无干扰。结果见图 1。

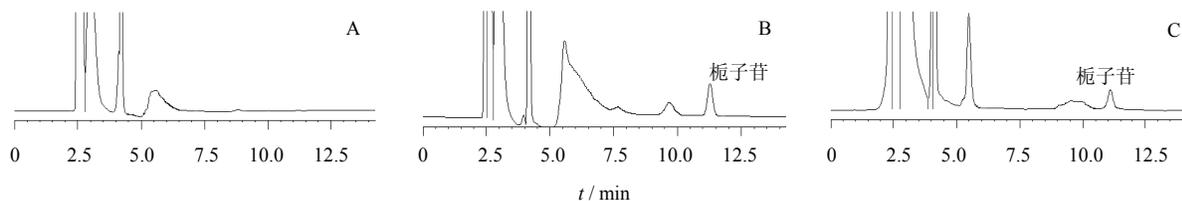


图 1 小鼠空白脑匀浆 (A)、空白脑匀浆+栀子苷对照品 (B)、给药后脑匀浆 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank brain homogenate of mice (A), blank brain homogenate of mice + geniposide reference substances (B), and brain homogenate sample of mice after iv injected by Xingnaojing Injection (C)

2.5.2 线性关系考察 取小鼠空白全脑, 加入生理盐水匀浆, 即得空白脑匀浆液。向 1.5 mL 离心管中分别加入 10.8 μg/mL 栀子苷储备液 60、40、32、24、16 μL 以及 1.08 μg/mL 栀子苷储备液 80、40、20 μL, 吹干, 加入 1 mL 空白脑匀浆液, 涡旋混合 30 s, 按“2.3”项下方法处理, 按“2.1”项下方法测定。

以脑中栀子苷的质量分数为纵坐标 (Y), 以栀子苷峰面积为横坐标 (X), 进行线性回归, 得到回归方程为 $Y=2.773 \times 10^{-2} X-22.642$, $r=0.999 1$ 。表明小鼠脑中栀子苷质量分数在 54~1 620 ng/g 时, 峰面积与脑中药物质量呈良好的线性关系。最低检测限为 10 ng/g ($S/N \geq 3$)。

2.5.3 精密度试验 取栀子苷对照品溶液置 1.5 mL 离心管中, 吹干, 加入小鼠空白脑匀浆液 1 mL, 配制栀子苷质量分数分别为 216、864、1 620 ng/g 的脑匀浆液。按“2.3”项下方法处理, 按“2.1”项下方法测定 ($n=5$)。结果栀子苷质量分数分别为 216、864、1 620 ng/g 的脑匀浆液日内精密度的 RSD 分别为 1.67%、2.02%、0.71%, 日间精密度的 RSD 分别为 4.09%、2.11%、3.80%。

2.5.4 稳定性试验 取栀子苷对照品溶液置 1.5 mL 离心管中, 吹干, 加入小鼠空白脑匀浆液 1 mL, 制备栀子苷质量分数分别为 216、864、1 620 ng/g 的脑匀浆液各 5 份, 涡旋混合 30 s, 室温放置, 于 0、12、24 h 按“2.3”项下方法处理, 按照“2.1”项下方法测定。将所得的峰面积代入线性方程计算栀子苷的质量分数, 比较在不同时间其质量分数的变化。结果显示, 含药脑匀浆稳定性符合药动学实验要求, 栀子苷分别为 216、864、1 620 ng/g 的脑匀浆液在 24 h 内稳定性的 RSD 分别为 2.34%、2.58%、3.07%。

2.5.5 回收率试验 取栀子苷对照品溶液置 1.5 mL 离心管中, 吹干, 加入小鼠空白脑匀浆液 1 mL, 制备栀子苷质量分数分别为 216、864、1 620 ng/g 的脑匀浆液, 按“2.3”项下方法处理, 按“2.1”项下方法测定。结果见表 1。

表 1 栀子苷的回收率 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Recoveries of geniposide ($\bar{x} \pm s, n=5$)

栀子苷脑药 浓度 / (ng·g ⁻¹)	方法回收率 / %	萃取回收率 / %
216	98.72 ± 4.56	102.60 ± 4.28
864	104.13 ± 4.68	102.16 ± 4.48
1 620	97.15 ± 3.28	97.66 ± 3.25

2.6 药动学实验

小鼠 40 只尾 iv 醒脑静注射液 18 mg/kg, 分别于注射后 1、3、5、10、30、60、90、120 min 摘眼球放血后脱颈椎各处死 5 只小鼠, 按“2.3”项下方法操作, 按“2.1”项下方法测定, 代入线性方程计算不同时间点栀子苷的脑药浓度。平均脑药浓度经时曲线见图 2。

栀子苷脑药浓度经时数据用 Kinetica 药动学软件拟合, 拟合方法选择非房室模型, 主要药动学参数 C_{max} 为 (1246.0 ± 520.7) ng/g, t_{max} 为 1 min, MRT 为 (50.5 ± 1.9) min, AUC 为 (35 780.3 ± 6 148.0) ng/(g·min)。

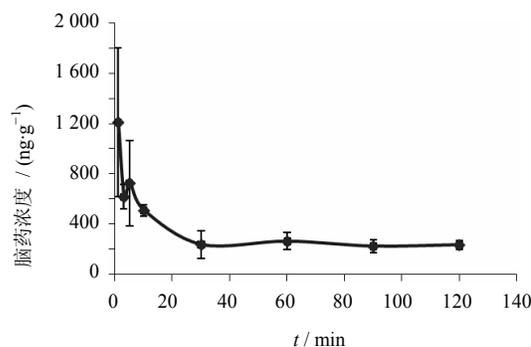


图 2 小鼠尾 iv 醒脑静注射液后栀子苷平均脑药浓度经时曲线 ($n=5$)

Fig. 2 Mean brain drug concentration-time curve of mice after iv injected by Xingnaojing Injection ($n=5$)

3 讨论

本实验采用简便易行的 HPLC-UV 法测定小鼠 iv 醒脑静注射液后脑匀浆中栀子苷的量, 结果表明栀子苷的保留时间约 11 min, 与小鼠空白脑匀浆比较, 给予醒脑静注射液后小鼠脑匀浆中的栀子苷均能较好地分离, 不受代谢产物及内源性物质的干扰。经方法学验证, 该测定方法的线性关系、日内精密度、日间精密度、样品的稳定性和回收率均符合要求, 满足醒脑静注射给药后栀子苷脑药动力学研究的要求。

由于栀子苷水溶性很强, 因此本实验对 iv 醒脑静注射液后小鼠的脑匀浆采取了甲醇沉淀蛋白、沉淀液进一步吹干、少量溶剂复溶进样的处理方法, 使栀子苷的回收率很高, 实验的重复性好, 检测样品的质量浓度符合 HPLC 检测要求。前期研究发现, 甲醇 (用量在 2 倍以上) 对脑匀浆蛋白的沉淀效果较好, 在选择复溶溶剂时, 首先选择了流动相, 但发现样品中剩余的蛋白质可溶于流动相中, 大量样品进样时容易使色谱柱堵塞, 分析原因可能是流动相中水相比较, 经考察发现纯甲醇的复溶效果最好, 因此选择了甲醇为复溶溶剂^[4]。结果表明选择甲醇为复溶剂效果良好。

本实验结果显示, 小鼠 iv 给药后, 脑匀浆中栀子苷的 t_{max} 约 1 min, 表明醒脑静注射液给药后栀子苷可迅速吸收入脑。此外, 栀子苷在脑内消除较快, MRT 约 50 min, 表明醒脑静注射液维持有效脑药浓度的时间较短, 临床可能需要频繁给药。因此, 研究和开辟其他给药途径, 如口服、黏膜给药等, 对于研发更为高效、长效、方便、安全的醒脑静的新型制剂具有积极的意义。

参考文献

- [1] 杨全军, 范明松, 孙兆林. 栀子化学成分、药理作用及体内过程研究进展 [J]. 中国现代中药, 2010, 12(9): 7-12.
- [2] Lu Y, Du S Y, Chen X L, *et al.* The enhancing effect of natural borneol on the absorption of geniposide in rat via intranasal administration [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2011, 12(2): 143-148.
- [3] Lu Y, Du S Y, Bai J, *et al.* Bioavailability and brain-targeting of geniposide in gardenia-borneol co-compound by different administration routes in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(11): 14127-14135.
- [4] 王又红, 郭琳琳, 刘卫红, 等. 栀子苷在大鼠体内的药代动力学研究 [J]. 中医研究, 2011, 24(6): 29-31.