

mitochondrial membranes from ischemic reperfusion injury [J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1996, 38(6): 1171-1182.

[8] 沈玲红, 王彬尧, 王长谦, 等. 丹参注射液及其活性成分丹参素、原儿茶醛对人红细胞胞浆  $Ca^{2+}$  浓度影响的实验研究[J]. *中国中药杂志*, 2004, 29(10): 984-988.

[9] 邓强, 徐洪, 朱东亚. 诱生型一氧化氮合酶与脑缺血后期损伤[J]. *生命化学*, 1999, 11(3): 121-124.

[10] Leist M, Single B, Naumann H, *et al.* Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis[J]. *Exp Cell Res*, 1999, 249(2): 396-403.

[11] Ikeno S, Nagata N, Yoshida S, *et al.* Immature brain injury via peroxynitrite production induced by inducible nitric oxide synthase after hypoxic ischemia in rats[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2000, 26(3): 227-234.

[收稿日期] 2008-02-26

## 吉西他滨聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒在小鼠脑内的靶向分布

黄乐松<sup>1,2</sup>, 王春霞<sup>1</sup>, 陈志良<sup>3</sup>, 徐越<sup>2</sup>, 王羽伦<sup>1</sup>, 钟延松<sup>1</sup>, 刘园<sup>1</sup> (1. 南方医科大学南方医院, 广东 广州 510515; 2. 萍乡市人民医院药剂科, 江西 萍乡 337000; 3. 南方医科大学珠江医院神经外科, 广东 广州 510282)

**[摘要]** 目的: 研究聚山梨酯 80 包衣吉西他滨聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒(GCTB-PBCA-NP)在正常小鼠脑内靶向分布。方法: 建立生物样品中 GCTB 的高效液相色谱(HPLC)测定法, 并测定了小鼠给药后的血浆及脑组织中 GCTB 浓度。结果: 与 GCTB 溶液组、GCTB-PBCA-NP 胶体溶液组以及 1% 聚山梨酯 80+ 空白 PBCA-NP+ GCTB 混合液组相比, 1% 聚山梨酯 80 包衣 GCTB-PBCA-NP 能大大地增加脑组织内浓度, 差异有显著性( $P < 0.05$ )。结论: 1% 聚山梨酯 80 包衣 GCTB-PBCA-NP 有一定的脑靶向作用。

**[关键词]** 聚山梨酯 80; 吉西他滨; 聚氰基丙烯酸正丁酯; 纳米粒; 高效液相色谱法; 脑靶向

[中图分类号] R943 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2008)16-1332-05

## Study on targeting mice brain tissue by tween 80 coated gemcitabine polybutylcyanoacrylate nanoparticles

HUANG Lesong<sup>1,2</sup>, WANG Churxia<sup>1</sup>, CHEN Zhiliang<sup>1</sup>, XU Yue<sup>3</sup>, WANG Yulun<sup>1</sup>, ZHONG Yansong<sup>1</sup>, LIU Yuan<sup>1</sup> (1. Department of Pharmaceutical, Department of Anesthesiology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangdong Guangzhou 510515, China; 2. Department of pharmaceutical, Pingxing People's Hospital, Jiangxi Pingxiang 337000, China; 3. Department of Neurosurgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangdong Guangzhou 510282, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the target distribution 1% tween 80 coated gemcitabine polybutylcyanoacrylate nanoparticles(GCTB-PBCA-NP) in mice brain tissue. **METHODS** The HPLC methods for the determination of GCTB in serum and brain tissue were established and applied to determine GCTB in biological samples. **RESULTS** Compared with the groups of GCTB solution, GCTB-PBCA-NP colloidal solution and mixture solution of empty PBCA-NP + 1% tweer 80 + GCTB, the group of 1% tween 80 coated GCTB-PBCA-NP significantly increased the concentration of GCTB in brain of mice after tail intravenous injection( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION** The study demonstrates that the 1% tween 80 coated GCTB-PBCA-NP could reach the brain tissue.

**KEY WORDS:** tweer 80; gemcitabine; polybutylcyanoacrylate; nanoparticles; HPLC; targeting brain

纳米粒子(nanoparticles, NPs)是一类直径在 1~1 000 nm 之间固态胶体颗粒, 作为 NPs 的载体要求毒性低、生物相容性好、无免疫原性、可降解等, 能够与药物交联、吸附, 并能携带药物通过各种细胞膜, 甚至血脑屏障, 但是通过 BBB 的机制不是很清楚。载药纳米粒很容易被体内单核巨噬细胞系统(RES)器官(如肝、脾)摄取, 若要求达到其他非单

核巨噬细胞系统器官(如脑)就有很大困难。通过对 NPs 的修饰, 如: 表面亲水性修饰、中性电荷等。达到主动靶向的目的。Kreuter 等<sup>[1]</sup>在载有镇痛药的 NPs 表面上分别用 12 种表面活性剂进行包衣, 结果表明包有聚山梨酯-80 的 NPs 对小鼠的镇痛效果最佳。Gulyaev 等<sup>[2]</sup>以聚山梨酯-80 为包衣材料制备的多柔比星纳米粒在脑中的浓度是对照组的

[基金项目] 广东省科技计划项目(编号: 2005B30101008) [作者简介] 黄乐松, 男, 硕士研究生, 电话: 020-62787236, E-mail: huanglesong@sohu.com [通讯作者] 王春霞, 博士, 副主任药师, 电话: 020-62787728, E-mail: wangcx\_best@126.com.

60 倍。Alyautdin 等<sup>[3]</sup>已证实包有聚山梨酯 80 的 NPs 是以细胞内吞方式进入脑中。一些易于分解的多肽或不能通过血脑屏障的药物(如 dalargin、洛哌丁胺、筒箭毒碱)通过制成可生物降解纳米粒在动物身上有一定的治疗效果<sup>[4]</sup>。吉西他滨(gemcitabine, GCTB)是一个新型的脱氧胞苷拟似物和核苷还原酶抑制剂,属嘧啶类抗代谢肿瘤药物。它的结构、性质和代谢途径与阿糖胞苷相似<sup>[5]</sup>。为能延长 GCTB 在体内的作用时间,并且实现对脑部肿瘤治疗的靶向性,也是本实验选用 GCTB 的目的所在。

## 1 材料

Malvern-3000HS 光子相关光谱仪(英国 Malvern 公司); Waters 996 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); 氰基丙烯酸正丁酯(BCA); 吉西他滨(哈尔滨誉衡药业有限公司); 乙腈、甲醇均为色谱纯,其他试剂均为分析纯; 健康  $\delta$  昆明种小鼠 80 只[(18~22 g), 南方医科大学实验动物中心提供,合格证号: 2006B023, 随机分成 4 组, 每组分 5 个时间点, 每个时间点各 3 只]。

## 2 方法

### 2.1 药物制备及其分组

2.1.1 GCTB-PBCA-NP 及其冻干粉制备 乳化学聚合法制备 GCTB-PBCA-NP<sup>[6]</sup>, 称取一定量 GCTB 和稳定剂 Dextran 70 用纯化水溶解, 用稀盐酸调 pH 为 3, 在磁力搅拌下, 用注射器缓缓滴加用乙腈稀释的 BCA 单体, 乙腈与 BCA 的稀释比为 4:1, 滴加速度为  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 室温, 搅拌速度  $400 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 搅拌 4 h。然后用氢氧化钠溶液调 pH 为 7, 继续搅拌 30 min。减压抽滤, 得到有蓝色乳光的均匀胶体溶液。用高速冷冻离心机 ( $18\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) 冷冻离心 30 min, 取上清液, 用 UV-500 型分光光度计测定 GCTB-PBCA-NP 包封率为  $(54.1 \pm 2.4)\%$ , 载药量为  $(11.1 \pm 0.9)\%$ 。用光子相关光谱仪测得 GCTB-PBCA-NP 平均粒径为  $(112 \pm 9) \text{ nm}$ 。最后冷冻干燥, 得到 GCTB-PBCA-NP 冻干粉。

2.1.2 药物及其分组 第 1 组为 GCTB 对照品溶液; 第 2 组为 GCTB-PBCA-NP 冻干粉, 临用前用注射用水稀释至所需浓度; 第 3 组为 1% 聚山梨酯 80 包衣的 GCTB-PBCA-NP: 取冷冻干燥后的产品, 用适量的注射用生理盐水复溶后, 调整到适宜浓度, 加 0.1% 的聚山梨酯 80, 室温搅拌、孵化 0.5 h 后用于实验; 第 4 组为 1% 聚山梨酯 80、空白 PBCA-NP 和 GCTB 的混合溶液。

2.1.3 给药方法 所有制剂均采用尾静脉注射给

药方式, 给药剂量为  $2.58 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。每剂量组重复 3 只小鼠, 给药后在不同时间点, 即 5, 30, 45, 60, 90 min 时分别采集全血和脑组织样品。

### 2.2 样品处理

2.2.1 血浆样品的处理 小鼠摘除眼球, 眼眶取血, 用枸橼酸钠抗凝生化管收集,  $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上层血浆 100  $\mu\text{L}$ , 加入沉淀溶剂甲醇-乙腈 (1:9) 500  $\mu\text{L}$ , 涡旋混匀 1 min, 以  $9\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清液 200  $\mu\text{L}$  置另一离心管中,  $(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$  水浴中氧气流下吹干, 残留物加流动相 100  $\mu\text{L}$  溶解, 涡旋 1 min,  $15\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min 后, 取上清液 20  $\mu\text{L}$  进样测定。

2.2.2 脑组织样品的处理 取血后的小鼠, 断颈处死, 剖取每只小鼠的脑组织, 用生理盐水漂洗, 除去残留血液及内容物, 滤纸吸干水分, 然后每克脑组织用 5 mL 冷冻生理盐水匀浆,  $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取组织匀浆液 100  $\mu\text{L}$ , 其余步骤同血浆样处理。

### 2.3 HPLC 法色谱条件及贮备液的配制

2.3.1 色谱条件<sup>[7]</sup> 色谱柱: Phenomenex Luna 5  $\mu\text{m}$  18(2) ( $150 \text{ mm} \times 4.60 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ); 流动相:  $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  醋酸铵缓冲液(取醋酸铵 3.08 g 加去离子纯化水 1 000 mL, 用冰醋酸调节 pH 至 5.5)-乙腈 (97.5:2.5); 流速:  $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ ; 检测波长: 268 nm; 柱温:  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

2.3.2 GCTB 标准品贮备液的配制 精密称取 11.0 mg GCTB 标准品加到 100 mL 量瓶中, 定容, 得到  $110 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  贮备液, 用加样枪分别精密取 10, 20, 40, 50, 100, 250  $\mu\text{L}$  贮备液, 加到 10 mL 量瓶中, 定容, 得分别为 0.11, 0.22, 0.44, 0.55, 1.10, 2.75  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  溶液。

### 2.4 血浆样品方法学考察

2.4.1 血浆样品 GCTB 标准曲线的建立 取空白血浆 100  $\mu\text{L}$ , 加 GCTB 对照品系列工作液 10  $\mu\text{L}$ , 配制成相当于血浆质量浓度为 10.0, 20.0, 40.0, 50.0, 100.0, 250.0  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的样品, 按血浆生物样品处理项下依法操作, 按照上述色谱条件, 进行 HPLC 法检测, 以血浆的 GCTB 浓度为横坐标, 以血浆的 GCTB 浓度相应的峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 得血浆样品 GCTB 标准曲线的回归方程:  $A = 2\,175.812C - 33\,493.4$ ,  $r = 0.999\,8$ , 表明血浆样品 GCTB 在 10.0~250.0  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内线性关系良好。

2.4.2 血浆样品日内、日间精密度, 方法回收率的考察 按对照品血浆样品的配制方法, 取空白血浆加入 GCTB 对照品贮备液, 制备为 15.0, 50.0,

200.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的低、中、高 3 个质量浓度的 GCTB 对照品血浆样品, 每个浓度各 3 份, 按血浆生物样品处理项下操作, 根据血浆样品 GCTB 的峰面积, 按血浆样品 GCTB 标准曲线的回归方程计算血浆样品浓度。将实测值与加入值相比, 得方法回收率。结果低、中、高 3 个浓度的方法回收率分别为 95.13%, 103.38%, 98.67%, RSD 分别为 3.29%, 2.89%, 1.33% ( $n=3$ ); 将上述低、中、高 3 个浓度的 GCTB 对照品血浆样品, 每个浓度各 5 份, 于 1 d 内测定, 计算日内精密度, RSD 为 6.49%, 3.90%, 1.61% ( $n=5$ ); 每份隔日测定 1 次, 连续测定 5 d, 计算日间精密度, 其 RSD 分别为 2.48%, 2.12%, 2.72% ( $n=5$ )。

### 2.5 脑组织样品方法学考察

**2.5.1 脑组织样品 GCTB 标准曲线的建立** 取空白脑组织匀浆液 540  $\mu\text{L}$ , 加 GCTB 对照品系列工作液 10  $\mu\text{L}$ , 配制成 2.0, 4.0, 8.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的样品, 按脑组织生物样品处理项下操作, 按照上述色谱条件, 进行 HPLC 检测, 以脑组织的 GCTB 浓度为横坐标, 以脑组织的 GCTB 浓度相应的峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 得脑组织样品 GCTB 标准曲线的回归方程:  $A = 256.049C + 234.079$ ,  $r = 0.9999$ , 表明脑组织样品 GCTB 在 2.0 ~ 100.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  范围内线性关系良好。

**2.5.2 脑组织样品日内、日间精密度、方法回收率的考察** 取空白脑组织匀浆液加入 GCTB 对照品贮备液, 制备为 4.0, 20.0, 80.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的低、中、高 3 个质量浓度的 GCTB 对照品脑组织样品, 每个浓度各 3 份, 按脑组织生物样品处理项下操作, 根据脑组织样品 GCTB 的峰面积, 按脑组织样品 GCTB 标准曲线的回归方程计算脑组织样品浓度。将实测值与加入值相比, 得方法回收率。结果低、中、高 3 个浓度的方法回收率分别为 101.75%, 99.30%, 98.10%, RSD 分别为 4.42%, 7.39%, 6.05% ( $n=3$ ); 将上述低、中、高 3 个浓度的 GCTB 对照品脑组织样品, 每个浓度各 5 份, 于 1 d 内测定, 计算日内精密度, RSD 分别为 2.98%, 5.70%, 4.05% ( $n=5$ ); 每份隔日测定 1 次, 连续测定 5 d, 计算日间精密度, RSD 分别为 4.20%, 4.66%, 3.29% ( $n=5$ )。

### 3 结果

**3.1 各制剂在不同时间点的小鼠血浆样品 GCTB 浓度及其药动学参数** 用 HPLC 测定血浆样品 GCTB 的浓度, 得到各样品峰面积, 通过血浆样品 GCTB 标准曲线的回归方程, 求得各制剂不同时间

点血浆 GCTB 的浓度, 见表 1。

表 1 各制剂在不同时间点的小鼠血浆样品 GCTB 浓度( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

Tab 1 Concentration of GCTB in blood of mice after administration of GCTB formulations( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

	血浆样品 GCTB 质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$				
	5 min	30 min	45 min	60 min	90 min
①	214.2 $\pm$ 11.9	186.7 $\pm$ 12.2	139.5 $\pm$ 7.8	119.4 $\pm$ 13.4	101.1 $\pm$ 7.6
②	184.0 $\pm$ 9.0	162.3 $\pm$ 11.9	172.8 $\pm$ 12.3	134.1 $\pm$ 13.4	109.9 $\pm$ 9.2
③	162.0 $\pm$ 8.7	174.6 $\pm$ 5.3	163.4 $\pm$ 25.1	124.8 $\pm$ 10.4	110.9 $\pm$ 9.2
④	184.1 $\pm$ 9.9	161.2 $\pm$ 6.2	139.0 $\pm$ 15.6	120.0 $\pm$ 13.1	107.8 $\pm$ 13.1

注: ①为 GCTB 溶液; ②为 GCTB-PBCA-NP; ③为 1% 聚山梨酯 80 包衣 GCTB-PBCA-NP; ④为聚山梨酯 80+PBCA-NP+GCTB 溶液

各制剂在不同时间点的小鼠血浆样品 GCTB 浓度表明, GCTB 溶液组和 1% 聚山梨酯 80+ 空白 PBCA-NP+GCTB 混合液组在小鼠尾静脉注射后, 5 min 内迅速达到峰浓度, 然后下降。而 GCTB-PBCA-NP 胶体溶液组和 1% 聚山梨酯 80 包衣 GCTB-PBCA-NP 达峰浓度有一个延后过程。GCTB-PBCA-NP 胶体溶液组, 45 min 时达到峰浓度; 而 1% 聚山梨酯 80 包衣 GCTB-PBCA-NP 在 30 min 时达到峰浓度。图 1 为各制剂在不同时间点的小鼠血浆样品 GCTB 的血药浓度曲线。采用 PK-Solver 1.0 软件求得尾静脉注射各制剂后的药动学参数, 见表 2。

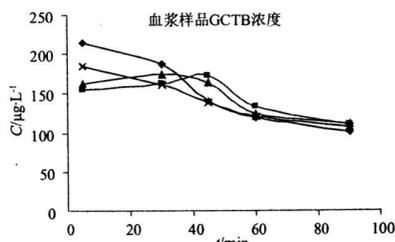


图 1 各制剂在不同时间点的小鼠血浆样品 GCTB 的血药浓度曲线 —◆—GCTB 溶液; —■—GCTB-PBCA-NP 胶体溶液; —▲—1% 聚山梨酯 80 包衣 GCTB-PBCA-NP; —×—1% 聚山梨酯 80+ 空白 PBCA-NP+GCTB 溶液

Fig 1 The plasma concentration curve of GCTB with different formulations at different time intervals after tail intravenous injection —◆—GCTB; —■—GCTB-PBCA-NP; —▲—1% tweer 80 GCTB-PBCA-NP; —×—1% tweer 80+ PBCA-NP+GCTB

表 2 尾静脉注射各制剂后的药动学参数( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

Tab 2 The pharmacokinetic parameters of GCTB with different formulations after tail intravenous injection( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

参数	各制剂组 GCTB			
	①	②	③	④
$t_{1/2}/\text{min}$	71.6 $\pm$ 5.2	188.7 $\pm$ 7.6	147.2 $\pm$ 7.0	101.5 $\pm$ 3.9
$V/\text{mL}\times 10^3$	11.3 $\pm$ 0.9	14.9 $\pm$ 1.8	14.2 $\pm$ 2.0	13.5 $\pm$ 1.3
$CL/\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	110.3 $\pm$ 4.7	50.6 $\pm$ 3.5	69.9 $\pm$ 7.3	93.2 $\pm$ 5.0
$AUC/\text{min}\cdot\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	23.6 $\pm$ 3.6	47.0 $\pm$ 5.2	38.5 $\pm$ 2.8	28.0 $\pm$ 3.8
$MRT/\text{min}$	99.2 $\pm$ 6.1	272.2 $\pm$ 9.1	212.4 $\pm$ 7.2	146.4 $\pm$ 6.8

注: ①为 GCTB 溶液; ②为 GCTB-PBCA-NP; ③为 1% 聚山梨酯 80 包衣 GCTB-PBCA-NP; ④为聚山梨酯 80+PBCA-NP+GCTB 溶液

3.2 各制剂在不同时间点的小鼠脑组织样品 GCTB 浓度 用 HPLC 测定脑组织中样品 GCTB 的浓度, 得到各样品峰面积, 通过脑组织样品 GCTB 标准曲线的回归方程, 求得各制剂不同时间点脑组织 GCTB 的浓度, 再换算成脑组织中 GCTB 的单位含量( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 见表 3。

表 3 各制剂在不同时间点的小鼠脑组织中 GCTB 的含量 ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Tab 3 Concentration of GCTB in blood of mice after administration of GCTB formulations ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

	5 min	30 min	45 min	60 min	90 min
①	4.8 ± 0.8	4.95 ± 0.19	7.6 ± 1.3	3.3 ± 0.4	5.2 ± 0.6
②	15.0 ± 1.6	12.4 ± 1.7	18.1 ± 2.7	21.1 ± 1.6	12.2 ± 0.8
③	31.3 ± 1.6	49.6 ± 1.5	59.4 ± 6.5	42.3 ± 3.3	31.2 ± 1.1
④	10.2 ± 1.7	9.9 ± 0.8	11.9 ± 1.1	8.0 ± 1.3	8.2 ± 1.2

注: ① 为 GCTB 溶液; ② 为 GCTB-PBCA-NP; ③ 为 1% 聚山梨酯 80 包衣 GCTB-PBCA-NP; ④ 为聚山梨酯 80+ PBCA-NP+ GCTB 溶液

各制剂在不同时间点的小鼠脑组织中 GCTB 浓度, 采用 SPSS 10.0 统计软件行多处理因素方差分析, 进行统计学处理, 组间多重比较采用 LSD 法, 与制剂 ①、②、④ 相比, 制剂 ③ 差异均有显著性 ( $P < 0.05$ ), 表明聚山梨酯 80 包衣的 GCTB-PBCA-NP 能进入血脑屏障。但制剂 ①、②、④ 之间差异无显著性 ( $P > 0.05$ ), 与制剂 ① 相比, 制剂 ② 和 ④ 能增加脑组织样品中 GCTB 的浓度。各制剂在不同时间点的小鼠脑组织中 GCTB 含量 ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 见图 2。

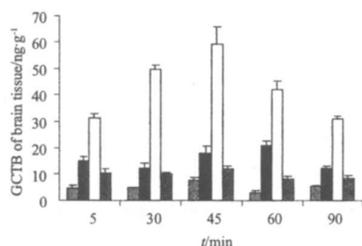


图 2 尾静脉注射不同时间点的小鼠脑组织 GCTB 含量  
— GCTB 溶液; —■—GCTB-PBCA-NP 胶体溶液; —□—1% 吐温 80 包衣 GCTB-PBCA-NP; — —1% 吐温 80+ 空白 PBCA-NP+ GCTB 混合液

Fig 2 Brain distribution of GCTB with different formulations at different time intervals after tail intravenous injection  
— GCTB; —■—GCTB-PBCA-NP; —□—1% Tween 80 GCTB-PBCA-NP; — —1% Tween 80+ PBCA-NP+ GCTB

#### 4 讨论

在生物样品处理过程中, 国外文献报道大多采用异丙醇沉淀蛋白质<sup>[8,10]</sup>, 本实验参考林能明等<sup>[7]</sup>的方法, 用甲醇-乙腈(1:9)混合沉淀蛋白质。由于 NPs 粒径小, 在样品处理过程中, 首先用离心 ( $3\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min) 的方法, 含药 NPs 一般不会与蛋白质和红细胞一起沉淀, 而且在测定生物样品中 GCTB 浓度时, 样品中的成分与 GCTB 的

峰分离度好。

已知 GCTB 的人体给药量为  $1\ \text{g} \cdot \text{m}^{-2}$ , 采用了人与动物 (KM 小鼠) 的体表面积计算法来换算, 得到小鼠按体质量给药剂量为  $2.58\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。由于 GCTB 吉西他滨的消除与阿糖胞苷相似, 在体内胞嘧啶核苷脱氨酶的作用下很快转变成无活性的代谢产物。GCTB 在短时间的输注下, 本品的  $t_{1/2}$  约为 32~94 min; 在结束输注 5 min 内, 本品达到血浆峰浓度, 故实验设计的不同时间点分别为 5, 30, 45, 60, 90 min。在本实验中各制剂在不同时间点的小鼠血浆样品 GCTB 质量浓度 ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 也表明 GCTB 溶液组和 1% 聚山梨酯 80+ 空白 PBCA-NP + GCTB 混合液组在小鼠尾静脉注射后, 迅速达到峰浓度, 然后下降。但是 GCTB-PBCA-NP 胶体溶液组和 1% 聚山梨酯 80 包衣 GCTB-PBCA-NP 达峰浓度有一个延后过程。

与 GCTB 溶液组、GCTB-PBCA-NP 胶体溶液组以及 1% 聚山梨酯 80+ 空白 PBCA-NP+ GCTB 混合液组相比, 1% 聚山梨酯 80 包衣 GCTB-PBCA-NP 能大大地增加脑组织内浓度, 且差异具显著性 ( $P < 0.05$ )。GCTB 溶液组、GCTB-PBCA-NP 胶体溶液组及 1% 聚山梨酯 80+ 空白 PBCA-NP + GCTB 混合液组之间差异无显著性 ( $P > 0.05$ ), 与 GCTB 溶液组相比, GCTB-PBCA-NP 胶体溶液组及 1% 聚山梨酯 80+ 空白 PBCA-NP+ GCTB 混合液组能增加脑组织样品中 GCTB 的浓度。

#### 参考文献:

- [1] Kreuter J, Petroy VE, Kharkevich DA, et al. Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across the blood brain barrier using surfactant coated nanonparticles[J]. J Controlled Release, 1997, 49(1): 81-87.
- [2] Gulyaev AE, Gelperina SE, Skidan IN, et al. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80 coated nanoparticles[J]. Pharm Res, 1997, 16(10): 1564-1569.
- [3] Alyautdin R, Gothier D, Petrov V, et al. Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80 coated poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles [J]. Eur J Pharm Biopharm, 1995, 41(1): 44-48.
- [4] Ramge P, Unger RE, Oltrogge JB, et al. Polysorbate 80 coating enhances up take of polybutylcyanoacrylate (PBCA) - nanoparticles by human and bovine primary brain capillary endothelial cells [J]. Eur J Neuro Sci, 2000, 12(6): 1931-1940.
- [5] 张彩霞, 林能明. 吉西他滨药动力学研究进展[J]. 肿瘤学杂志, 2004, 10(4): 271-274.
- [6] 黄乐松, 王春霞, 陈志良, 等. 吉西他滨聚氰基丙烯酸酯正丁酯纳米粒的制备工艺[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(11): 1653-1656.
- [7] 林能明, 曾苏, 马胜林, 等. RP-HPLC 法测定人体血浆中吉西他滨的浓度[J]. 药物分析杂志, 2004, 24(5): 453-456.
- [8] Kerr JZ, Berg SL, Dauser R, et al. Plasma and cerebrospinal

fluid pharmaceutical of gemcitabine after intravenous administration in nonhuman primates[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2001, 47(5): 411-414.

- [9] Kiani A, Kohne CH, Franz T, *et al*. Pharmacokinetics of gemcitabine in a patient with end stage renal disease: effective clearance of its main metabolite by standard hemodialysis treatment[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2003, 51(3): 266-270.

[10] Freeman KB, Anliker S, Hamilton M, *et al*. Validated assays for the determination of gemcitabine in human plasma and urine using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. *J Chromatogr B*, 1995, 665(1): 171-181.

[收稿日期] 2007-10-16

## 液-质联用测定益智合剂中芍药苷的含量

温颖关<sup>1</sup>, 廖日房<sup>2</sup>, 陈健玲<sup>1</sup>, 潘燕<sup>3</sup> (1. 广州市脑科医院国家药品临床研究基地, 广东 广州 510370; 2. 中山大学附属第二医院药剂科, 广东 广州 510120; 3. 广东药学院 2007 届毕业生, 广东 广州 510070)

**[摘要]** 目的: 建立 HPLC-MS/MS 法测定益智合剂中芍药苷含量的方法。方法: 采用高效液相串联质谱法对益智合剂中痕量的芍药苷进行分析, 选用 ZORBAX C<sub>18</sub> 柱(2.1 mm×30 mm, 3.5 μm) 为色谱柱, 流动相为甲醇 5 mmol·L<sup>-1</sup> 甲酸铵(75:25), 流速为 0.4 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温: 25 °C。质谱条件: 电喷雾离子源(ESI), 检测方式为多离子反应监测(MRM), 负离子模式, 用于定量分析的离子为 *m/z* 525<sup>-</sup>449。结果: 用外标法定量分析, 线性范围为 20~5 000 μg·L<sup>-1</sup>, *r* = 0.999 9; 益智合剂中芍药苷的最低检测限为 2 μg·L<sup>-1</sup>; 精密度 RSD 为 0.84%; 平均加样回收率为 96.34%, RSD 为 2.45% (*n* = 5); 测得益智合剂中芍药苷的含量为 31.45 μg·L<sup>-1</sup>。结论: 本法操作简单、快捷, 结果准确可靠, 可作为有效检测益智合剂中的痕量成分芍药苷含量的方法。

**[关键词]** 益智合剂; 芍药苷; 高效液相串联质谱检测法

[中图分类号] R927.2 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2008)16-1336-03

## Determination of the content of paeoniflorin in Yizhi mixture by HPLC-MS/MS

WEN Yur-guan<sup>1</sup>, LIAO Ri-fang<sup>2</sup>, CHEN Jiar-ling<sup>1</sup>, PAN Yan<sup>3</sup> (1. Department of Clinical Pharmacology, Guangzhou Brain Hospital, Guangdong Guangzhou 510370, China; 2. Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong Guangzhou 510120, China; 3. Guangdong Pharmacy University, Guangdong Guangzhou 510070, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish an HPLC-MS/MS method for the determination of paeoniflorin in Yizhi mixture. **METHODS** HPLC: Agilent ZORBAX C<sub>18</sub> column (2.1 mm×30 mm, 3.5 μm), the mobile phase consisting of methanol-water solution (75:25), with 5 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium formate solvent mixture, the flow rate was 0.4 mL·min<sup>-1</sup>, column temperature was 25 °C. MS: Use electrospray ionization source. Paeoniflorin (MRM *m/z* 525<sup>-</sup>449) was detected by the Agilent 6410 triple quadrupole mass spectrometer system. **RESULTS** The linear range was 20-5 000 μg·L<sup>-1</sup> (*r* = 0.999 9), the mean recovery was 96.34%, RSD was 2.45% (*n* = 5). **CONCLUSION** The method is simple, sensitive and accurate. The established method can be used for quality control of Yizhi mixture.

**KEY WORDS:** Yizhi mixture; paeoniflorin; LC-MS/MS

益智合剂为我院自行研制的合剂, 主要用于儿童多动症的临床治疗<sup>[1]</sup>。该中药方剂主要由鹿角霜、山茱萸、浮小麦、石菖蒲、黄柏、远志、白芍等 17 味中药材组成, 经加水煎煮 2 次, 合并滤液浓缩而成。传统中医学认为该方具有增补肝肾精血, 肝阳得潜, 心神安宁, 使多动、注意力涣散等症状消除等功效<sup>[1-3]</sup>。为有效控制该制剂质量保证临床用药安全有效, 本实验拟建立测定该合剂中芍药苷含量的方法。

### 1 材料

HPLC Agilent 1200, Agilent 6410 Triple Quad LC/MS, Agilent 色谱化学工作站(软件版本编号 B.01.00); 芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110736-200320, 供含量测定用); 益智合剂(广州市精神病院制剂室自制, 规格: 200 mL/瓶); 乙腈、甲醇、甲酸铵为色谱纯; 水为注射用水; 其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件 液相条件 色谱柱为 Agilent ZOR-