

· 临床研究 ·

## 固相萃取与液质联用法分析东莨菪碱经鼻腔给药的脑靶向性

李萍<sup>1</sup>, 王化芬<sup>1</sup>, 史卫峰<sup>2</sup>, 刘兰兰<sup>3</sup>, 刘卫<sup>1△</sup>

(1. 解放军第八十八医院, 山东泰安 271000; 2. 泰山医学院生命科学研究所以, 山东泰安 271000; 3. 山东省济南市药检所 250011)

**摘要:**目的 研究东莨菪碱经鼻腔给药的脑靶向性。方法 将 Wistar 大鼠分为两组, 分别通过腹腔和鼻腔给予 0.3 mg 东莨菪碱。用固相萃取和液质联用的方法测定在 5、10、20、30、60、120、240、480 min 血浆和脑组织匀浆中东莨菪碱的浓度, 计算并比较腹腔和鼻腔给药后的药代动力学参数。结果 东莨菪碱鼻腔给药的生物利用度为 65%。经鼻腔给药后的脑药浓度大于经腹腔给药的脑药浓度, 鼻腔给药东莨菪碱的脑药浓度与血药浓度的比值远大于腹腔给药后脑药浓度与血药浓度的比值 ( $P < 0.05$ )。结论 东莨菪碱鼻腔给药具有脑靶向性。

**关键词:** 东莨菪碱; 给药, 鼻内; 固相萃取; 液质联用

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.36.017

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)36-4405-03

## Analysis on brain targeting of scopolamine following intranasal administration by using solid phase extraction and LC/MS assay

Li Ping<sup>1</sup>, Wang Huaifen<sup>1</sup>, Shi Weifeng<sup>2</sup>, Liu Lanlan<sup>3</sup>, Liu Wei<sup>1△</sup>

(1. The 88th Hospital of PLA, Taian, Shandong 271000, China; 2. Life Sciences Institute of Taishan Medical College, Taian, Shandong 271000, China; 3. Food and Drug Administration of Jinan City, Jinan, Shandong 250014, China)

**Abstract: Objective** To investigate the distribution of scopolamine into brain following intranasal. **Methods** Adult Wistar rats were divided into two groups, and administrated with scopolamine 0.3 mg via intraperitoneal or intranasal respectively. Two groups of blood concentration and brain concentration of scopolamine were determined by solid phase extraction (SPE) and LC/MS assay at the time point of 5, 10, 20, 30, 60, 120, 240, 480 min, and their kinetic parameters were calculated and compared. **Results** Scopolamine bioavailability of intranasal administration was 65%, and the maximum concentration of scopolamine in brain following intranasal administration was much higher than that following intraperitoneal administration. Comparing the ratio of AUC in brain and in plasma, ratio of intranasal administration is bigger than that of intraperitoneal administration significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** It was concluded that scopolamine's intranasal administration induced the agent targeting distribution into the brain.

**Key words:** scopolamine; administration, intranasal; solid phase extraction; LC/MS assay

东莨菪碱 (scopolamine) 是一个经典的 M 受体阻断剂, 防治晕动病的作用在军事医学上有重要意义<sup>[1]</sup>, 为此, 研制给药方便并快速入脑起效的东莨菪碱制剂一直受到重视, 新近有研究考察了东莨菪碱口服或经皮给药在机体各组织的分布<sup>[2-3]</sup>。考虑到有的药物经鼻给药能快速入脑, 本文在用液质联用方法建立东莨菪碱血药浓度和脑药浓度检测方法的基础上, 比较了在大鼠鼻腔给药和腹腔注射相同剂量东莨菪碱后药物动力学特点, 以确定东莨菪碱经鼻腔给药是否具有脑靶向性。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物** Wistar 大鼠, 雌性, 体质量 180~220 g, 购自山东中医药大学实验动物中心。

**1.2 仪器与试剂** 东莨菪碱乳膏 (济南军区总医院药剂科产品, 含氢溴酸东莨菪碱 0.1%)。氢溴酸东莨菪碱 (对照品), 由济南军区总医院胡冠时主任药师惠赠。临用前用 50% 甲醇配成 0.1 mg/mL 标准液。阿普唑仑 (内标) (标准品), 购自中国药品生物制品检定研究院。临用前用 50% 甲醇配成 2 μg/mL 的内标液。LC/MS 联用系统, 由质谱 (mass spectrometry, MS) 系统 (Waters ZQ4000 型质谱仪, 配有离子喷雾离子化源, 美国 Waters 公司) 和液相 (liquid chromatography, LC) 系统 [Waters 2695 型高效液相色谱仪 (配有输注泵, 自动进样器, 柱温箱, 二极管阵列检测器), 美国 Waters 公司] 组成。色谱柱: Zorbax XDB-C18 柱, 5 μm 粒径, 150×4.6 mm I. D. (美国 Agilent 公司)。Oasis MCX 固相萃取小柱 (美国 Waters 公司)。

## 1.3 方 法

**1.3.1 采集样品** 大鼠用乙醚麻醉, 断头取血不少于 2 mL, 置离心管中, 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 抗凝, 加入 1 mol/L 的 HCl 0.10 mL。常温下 4 000 r/min 离心 10 min, 分离血浆, 以备固相萃取。分离脑组织, 注意保留嗅球, 置匀浆器中, 加入等量氯化铵缓冲液, 匀浆, 以备固相萃取。

**1.3.2 固相萃取**<sup>[4-5]</sup> 固相萃取小柱经 2 mL 甲醇活化, 用 2 mL 纯化水平衡。取血浆 2 mL 或组织匀浆样品加压滤过, 弃去滤过液。先后用 0.1 mol/mL 盐酸、甲醇加压滤过清洗, 弃去滤过液。用甲醇 (含 4% 氨水) 洗脱, 洗脱液接入离心管中, 在水浴温度不超过 50 °C 的环境中用氮气挥干洗脱液, 用 50% 甲醇溶液 2.00 mL 复溶。

**1.3.3 LC/MS 使用方法** 流动相: 乙腈, 氨水调 pH 值为 10.4。柱温: 室温。扫描波长: 200~300 nm, 进样量: 50 μL。离子源: 离子喷雾离子化源; 检测方式: 正离子方式检测; 东莨菪碱和内标阿普唑仑用于定量分析的离子反应分别为 m/z 304 和 m/z 310, 毛细管电压 3.2 kV, 锥孔电压 2.8 V, 源温度 105 °C, 脱溶剂气流量 350 L/h, 锥孔气流量 30 L/h。在给定的色谱和质谱条件下, 积分测定东莨菪碱和阿普唑仑的峰面积, 以阿普唑仑为内标, 与标准曲线对照得到样品中氢溴酸东莨菪碱的含量。

**1.3.4 给药方法** 大鼠的鼻腔给药: 大鼠用乙醚麻醉后, 用自制的大鼠鼻腔给药装置, 将东莨菪碱乳膏 30 mg (含氢溴酸东莨菪碱 0.03 mg) 均匀地涂抹在大鼠单侧鼻腔黏膜上 (实验

组)。大鼠的腹腔给药:大鼠用乙醚麻醉后,经腹腔注射氢溴酸东莨菪碱注射液(含氢溴酸东莨菪碱 0.3 mg/mL)0.1 mL(对照组)。给药大鼠的处置:大鼠给药后 5、10、20、30、60、120、240、480 min,乙醚麻醉,断头处死,取血浆 2.00 mL 或脑匀浆 2.00 mL,加阿普唑仑标准液 20  $\mu$ L 作为内标,固相萃取,进样 50  $\mu$ L,测定东莨菪碱和阿普唑仑的峰面积,计算氢溴酸东莨菪碱的浓度,绘制药时曲线。

**1.3.5 精密度与准确度测定** 制备氢溴酸东莨菪碱低、中、高 3 个浓度(分别为 0.2、2.0、20.0 ng/mL)的样品 2 mL,加内标 20  $\mu$ L,根据东莨菪碱的峰面积/阿普唑仑的峰面积和标准曲线计算氢溴酸东莨菪碱含量,计算精密度和准确度。

**1.3.6 基质效应<sup>[6-7]</sup>测定** 制备氢溴酸东莨菪碱低、中、高 3 个浓度(分别为 0.2、2.0、20.0 ng/mL)的对照品溶液,于 40  $^{\circ}$ C 水浴中氮气吹干,上述 3 种浓度样品分成 A、B 两组(每组每个浓度各 6 份样品),A 组用流动相 80  $\mu$ L 涡旋 30 s 溶解;B 组用空白生物基质(空白血浆或脑匀浆样品经处理后得到的上清液,每个浓度的 6 份血浆样品,分别使用 6 份不同来源的空白血浆制作)80  $\mu$ L 涡旋 30 s 溶解。分别进样,计算 B 组峰面积与 A 组峰面积的比值以考察样品的基质效应。内标的基质效应以相同方法考察。

**1.4 统计学处理** 采用的 SPSS13.0 软件进行数据处理,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。不同剂量组间比较采用 SNK-*q* 检验。以东莨菪碱浓度为纵坐标,时间为横坐标作图,用 3p97 计算药代动力学参数。不同给药方法的两组间药-时曲线下面积(AUC)比较采用 *t* 检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ ,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 东莨菪碱检测方法的建立

**2.1.1 方法的专属性** 在给定的色谱质谱条件下,东莨菪碱( $M^+ = 284$ )和内标阿普唑仑的峰形良好,分离完全,血浆或脑匀浆中的内源性物质不干扰东莨菪碱和内标阿普唑仑的测定。东莨菪碱的定量下限为(0.02  $\pm$  0.005)ng/mL,  $n = 4$ ,  $S/N \geq 3$ ,见图 1。

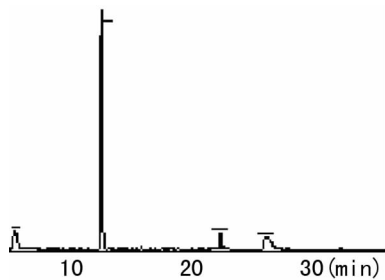


图 1 东莨菪碱的液质联用色谱图

**2.1.2 标准曲线的建立** 用大鼠的空白血浆或空白脑组织匀浆,配成药物浓度为 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 ng/mL 的氢溴酸东莨菪碱的系列溶液各 2 mL,加内标 20  $\mu$ L,混匀,固相萃取,进样,测定东莨菪碱和内标的峰面积,分别以血浆中或脑匀浆中氢溴酸东莨菪碱的浓度  $C$ (ng/mL)为横坐标,以东莨菪碱与内标阿普唑仑峰面积比值  $Y$  为纵坐标进行线性回归,求得标准曲线: $Y = 0.2471C - 1.201, r = 0.9907$  (血浆); $Y = 0.1489C + 0.0858, r = 0.9935$  (脑匀浆)。根据标准曲线,东莨菪碱的线性范围为 0.2~20.0 ng/mL。

**2.1.3 方法的回收率** 将测量值与实际量比较,计算回收率,结果见表 1。

**2.1.4 精密度、准确度及基质效应** 每一浓度进行 6 样本分

析,连续测定 3 轮,结果进行方差分析,求得准确度偏差(以相对偏差  $RE\%$  为指标)不超过  $\pm 6.2\%$ ,精密密度偏差(以相对标准差  $RSD\%$  为指标)不超过  $\pm 1.9\%$ 。按 1.3.6 方法计算得到的比值均在  $\pm 15\%$  之间,表明在本方法下基质效应对样品和内标的影响可以忽略。

表 1 东莨菪碱在血浆和在脑匀浆中的浓度及回收率( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

实际浓度 (ng/mL)	测定浓度(ng/mL)		回收率(%)	
	血浆	脑	血浆	脑
0.2	0.21 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.01	100.5 $\pm$ 2.9	103.5 $\pm$ 2.4
2.0	1.97 $\pm$ 0.14	2.09 $\pm$ 0.17	98.6 $\pm$ 6.7	104.6 $\pm$ 8.2
20.0	19.91 $\pm$ 1.27	19.98 $\pm$ 1.40	98.1 $\pm$ 3.2	98.3 $\pm$ 4.1

**2.2 东莨菪碱在大鼠体内的药物动力学和东莨菪碱乳膏的生物利用度** 腹腔给药和鼻腔给药血药浓度数据采用 3p97 药动力学程序拟合,符合两室模型: $C = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$ 。采用梯形法计算 AUC<sub>0-480</sub> 值。血药浓度-时间曲线如图 2 所示,血药浓度-时间的各种参数见表 2。比较二者 AUC<sub>0-480</sub> 值,鼻腔给药对腹腔给药的相对生物利用度为 65.46%。

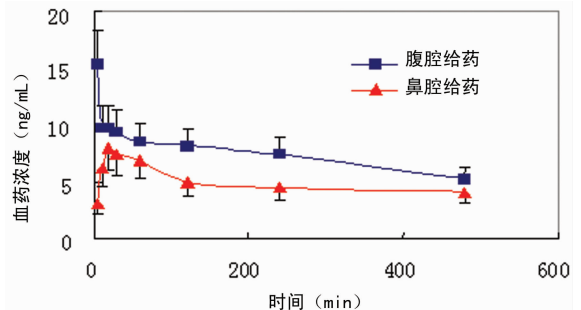


图 2 东莨菪碱经腹腔给药和经鼻腔给药后血药浓度的药时曲线比较

表 2 东莨菪碱经腹腔给药和经鼻腔给药后血药浓度的主要药动学参数

血药浓度参数	腹腔给药	鼻腔给药
$K_e$ (min)	0.001 6	0.001 7
$K_a$ (min)	1.942 0	0.290 7
$T_{1/2}(\alpha)$ (min)	0.356 9	2.385 0
$T_{1/2}(\beta)$ (min)	327.200 0	309.100 0
$T_{max}$ (min)	3.652 0	21.030 0
$C_{max}$ (ng/mL)	10.860 0	7.952 0
$V/F(c)$ (ng/mL)	0.002 7	0.003 2
$Cl/F(c)$ (ng/mL)	$4 \times 10^{-6}$	$5 \times 10^{-6}$
$AUC[(ng \cdot min)/mL]$	6 729.640 0	4 405.190 0

**2.3 东莨菪碱在脑中的药物浓度** 实验比较了腹腔注射和鼻腔给药两种途径使用氢溴酸东莨菪碱后大鼠脑中东莨菪碱浓度,结果表明,腹腔注射后 5 min 即可在脑中检测到东莨菪碱,其最高药物浓度约 4 ng/mL。鼻腔给药后脑中东莨菪碱浓度逐渐升高,最高时能超过 6 ng/mL,发生在给药后 30 min。脑药浓度-时间曲线如图 3 所示,脑药浓度-时间曲线的各种参数见表 3。

**2.4 东莨菪碱鼻腔给药脑靶向性的评价<sup>[8-9]</sup>** 为了确定鼻腔之间是否存在东莨菪碱的直接转运途径,采用不同时间段脑药浓度曲线下面积(AUC brain)与血药浓度曲线下面积(AUC plasma)的比值来进行靶向性比较。鼻腔、腹腔给药后 AUC

brain/AU plasma 计算结果分别见表 4。结果表明,在各时间段上,东莨菪碱鼻腔给药的 AUC brain/AUC plasma 值都大于腹腔注射,表明鼻腔给药时东莨菪碱入脑存在 BBB 以外的途径,也就是说,部分药物不经 BBB 入脑,因而有脑靶向性。

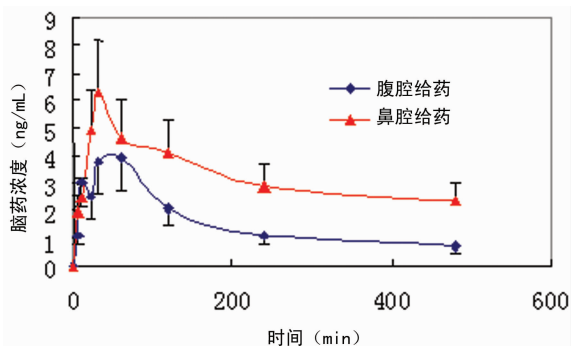


图 3 东莨菪碱经腹腔给药和经鼻腔给药后脑药浓度的药时曲线比较

表 3 东莨菪碱经腹腔给药和经鼻腔给药后脑药浓度的主要药动学参数

血药浓度参数	腹腔给药	鼻腔给药
Ke(min)	0.009 4	0.002 5
Ka(min)	0.042 1	0.103 2
T1/2(α/min)	16.460 0	6.720 0
T1/2(β/min)	73.450 0	278.000 0
Tmax(min)	45.770 0	38.780 0
Cmax(ng/mL)	3.560 0	5.275 0
V/F(c)(ng/mL)	0.005 5	0.005 2
Cl/F(c)(ng/mL)	5×10 <sup>-5</sup>	1×10 <sup>-5</sup>
AUC[(ng·min)/mL]	581.100 0	2 319.700 0

表 4 东莨菪碱经腹腔给药和经鼻给药后 AUC brain/AUC plasma 的比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

时间区间(min)	腹腔给药	鼻腔给药	P
0~60	0.19±0.07	0.58±0.11	<0.01
0~120	0.26±0.08	0.65±0.23	<0.05
0~240	0.15±0.04	0.75±0.20	<0.01
0~480	0.11±0.02	0.52±0.12	<0.01

### 3 讨 论

常用的东莨菪碱为氢溴酸盐,在给定的质谱条件下脱去氢溴酸得到东莨菪碱的分子离子峰。回收率实验、精密性与准确度实验表明,用东莨菪碱的分子离子(M<sup>+</sup> = 284)峰面积为指标,内标法实验能达到对东莨菪碱定量检测的要求。

东莨菪碱本身有良好的脂溶性,但其氢溴酸盐在溶液中使药物呈离子状态。调整溶液 pH 值可改善其脂溶性。有研究表明,氢溴酸东莨菪碱鼻腔给药吸收收入血的生物利用度与给药时的 pH 值有关<sup>[10]</sup>。

氢溴酸东莨菪碱腹腔给药与鼻腔给药的对比研究表明,两种条件下东莨菪碱的脑药浓度各有特点。特别是腹腔给药后,东莨菪碱在脑内的浓度呈现双峰。排除导致血药浓度双峰现象的原因<sup>[11-12]</sup>,认为导致脑药浓度波动的可能原因来自于动物本身,比如体液 pH 的微小差别可导致氢溴酸东莨菪碱解离程度的不同造成药物透过 BBB 的差别。另外,实验没有控制动物麻醉程度,而麻醉药能改变 BBB 的通透性。所以,实验不能否认麻醉是导致腹腔注射后东莨菪碱脑药浓度不稳定的原

因之一。

有的药物可经鼻腔直接吸收入脑,特别是小分子药物沿嗅通路转运入脑中的量同它们的脂溶性直接相关<sup>[13-14]</sup>。东莨菪碱分子量小,脂溶性好,具备经鼻入脑的条件。东莨菪碱腹腔注射后 AUC brain/AUC plasma 表示药物从血液循环经血脑屏障 BBB 进入到脑组织的程度,假如只存在 BBB 一条转运途径,那么鼻腔给药后因药物不能瞬时入血,则鼻腔给药的 AUC brain/AUC plasma 的比值应略低于腹腔给药或与腹腔给药相当。本研究在确认氢溴酸东莨菪碱乳膏鼻腔给药有东莨菪碱吸收入脑的基础上,证明氢溴酸东莨菪碱乳膏鼻腔给药后在脑中的分布浓度接近血药浓度的一半。通过比较不同给药途径下血药浓度和脑药浓度的药时曲线下面积证实了东莨菪碱鼻腔给药有脑靶向性。

### 参考文献:

- [1] 军事医学科学院. 军事医学研究院神经精神药理学研究进展[J]. 中国科学:生命科学,2011,41(10):884-889.
- [2] 夏天,石力夫,胡晋红. LC-MS/MS 法测定氢溴酸东莨菪碱在大鼠体内的组织分布[J]. 药物分析杂志,2012,32(1):26-29.
- [3] 陈芳,胡晋红,朱全刚. 用微透析法测定氢溴酸东莨菪碱凝胶经皮给药大鼠体内药动学研究[J]. 药学服务与研究,2012,12(4):270-273.
- [4] Zhang G, Jr AV, Bartlett MG. Bioanalytical methods for the determination of antipsychotic drugs [J]. Biomed Chromatogr,2008,22(7):671-687.
- [5] 孙海红,钱叶苗,宋相丽,等. 固相萃取技术的应用与研究新进展[J]. 现代化工,2011,32(S2):21-24.
- [6] 张才成,陈静,万腊根. 回收试验与基质效应[J]. 实验与检验医学,2011,29(3):269-271.
- [7] 韩南银,徐秉玖. 生物样品分析中基质效应和准确度的确定[J]. 中国新药杂志,2012,21(14):1607-1610.
- [8] Chen J, Wang X, Wang J, et al. Evaluation of brain-targeting for the nasal delivery of erogoloid mesylate by microdialysis method in rats[J]. Eur J Pharm Biopharm,2008,68(3):694-700.
- [9] Wang Q, Chen G, Zeng S. Pharmacokinetics of Gastrodin in rat plasma and CSF after i. n. and i. v.[J]. Int J Pharm, 2007,341(1-2):20-25.
- [10] Ahmed S, Sileno AP, deMeireles JC, et al. Effects of pH and dose on nasalabsorption of scopolamine hydrobromide in human subjects[J]. Pharm Res,2000,17(8):974-977.
- [11] 陈曦,马越鸣,钟杰. 药物浓度-时间曲线双峰现象研究进展[J]. 中国新药与临床杂志,2012,31(8):432-435.
- [12] Godfrey KR, Arundel PA, Dong Z, et al. Modelling the double peak phenomenon in pharmacokinetics[J]. Comput Methods Programs Biomed,2011,14(2):62-66.
- [13] 张兆芹. 脑靶向给药技术的研究现状[J]. 实用医药杂志, 2010,27(12):1129-1132.
- [14] 金露薇,魏元锋,高缘. 中药化学成分透血脑屏障机制及促透方法研究进展[J]. 中草药,2013,44(15):2183-2188.