

## 液液微萃取 GC-MS 分析香茅草提取物给予大鼠后血浆中 $\beta$ -榄香烯及药代动力学特征

李涛<sup>1,2</sup>, 冯雪<sup>3</sup>, 冯雪<sup>1</sup>, 彭娟<sup>2</sup>, 赵小亮<sup>2</sup>, 李佳<sup>4</sup>, 杨伟鹏<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700; 3. 石药集团远大(大连)制药有限公司, 辽宁 大连 116600; 4. 清华大学医院, 北京 100084)

**摘要:** 建立简便、灵敏的气质联用 (GC-MS) 法测定大鼠血浆中  $\beta$ -榄香烯浓度, 并研究香茅草提取物在大鼠体内的药代动力学特征。血浆样品采用 0.5 倍体积正己烷液液微萃取的前处理方法。DB-5ms 色谱柱 (30 m×0.25 mm, 0.25  $\mu$ m); 程序升温, 载气为氦气, 流速为 0.15 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量为 2  $\mu$ L。采用电子轰击离子源和单离子监测模式, 电子轰击能量 70 eV, 选择监测的离子为  $m/z$  128 (内标萘) 和  $m/z$  93 ( $\beta$ -榄香烯)。大鼠分别灌胃和静脉给药香茅草提取物 (合  $\beta$ -榄香烯 55 mg·kg<sup>-1</sup>), 使用小动物自动采血技术收集和制备血浆。结果血浆中  $\beta$ -榄香烯在 1.0~250 ng·mL<sup>-1</sup> 浓度内线性关系良好 ( $r = 0.997$ ), 定量下限为 1.0 ng·mL<sup>-1</sup>, 准确度为 -4.47% ~ -0.85%, 提取回收率在 56.02%~66.89% 之间, 无明显基质效应 (94.28%~108.63%)。大鼠灌胃香茅草提取物,  $\beta$ -榄香烯主要药代学参数 AUC<sub>0-t</sub> 为 (23.56 ± 4.40) ng·mL<sup>-1</sup>,  $t_{max}$  为 (1.67 ± 0.58) h,  $C_{max}$  为 (7.36 ± 0.69) ng·mL<sup>-1</sup>, MRT<sub>0-t</sub> 为 (2.76 ± 0.27) h,  $t_{1/2z}$  为 (2.73 ± 1.36) h,  $V_z$  为 (7.39 ± 3.18) L·kg<sup>-1</sup>, CL<sub>z</sub> 为 (1.95 ± 0.51) L·h<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>, 绝对生物利用度约为 8.78%。该方法简便、准确, 灵敏度高, 适用于香茅草提取物中  $\beta$ -榄香烯在大鼠体内的药代动力学特征研究。所有动物实验过程和动物关怀均得到中国中医科学院中药研究所伦理委员会的批准。

**关键词:**  $\beta$ -榄香烯; 药代动力学; 液液微萃取; GC-MS; 香茅草

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)07-1820-06

## Development of a liquid-liquid microextraction GC-MS method for simultaneous determination and pharmacokinetic analysis of $\beta$ -elemene in rat plasma after administration of citronella grass extract

LI Tao<sup>1,2</sup>, FENG Xue<sup>3</sup>, FENG Xue<sup>1</sup>, PENG Juan<sup>2</sup>, ZHAO Xiao-liang<sup>2</sup>, LI Jia<sup>4</sup>, YANG Wei-peng<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. CSPC Yuanda (Dalian) Pharmaceutical Co., Ltd., Dalian 116600, China; 4. Tsinghua University Hospital, Beijing 100084, China)

**Abstract:** We established a simple and sensitive GC-MS method for the determination of  $\beta$ -elemene in rat plasma and measured the pharmacokinetics of citronella grass extract in rats. Plasma samples were pretreated using liquid-liquid microextraction: 100  $\mu$ L of plasma sample (containing naphthalene as the internal standard) was extracted with 50  $\mu$ L of *n*-hexane. The determination was performed on DB-5ms column (30 m×0.25 mm, 0.25  $\mu$ m). The initial column temperature was 60 °C and raised to 160 °C at a rate of 50 °C·min<sup>-1</sup>, maintained for 3 min, and finally increased to 260 °C for 3 min. Helium was the carrier gas and the flow rate was 0.15 mL·min<sup>-1</sup>. The injection volume was 2  $\mu$ L. EI and selected monitored ions pattern were used for ion scanning with  $m/z$  128 (naphthalene)

收稿日期: 2021-04-02; 修回日期: 2021-05-18.

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (ZZ2019008, ZZ14-YQ-041).

\*通讯作者 Tel: 86-10-64046469, E-mail: yangweipeng@icmm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0477

and  $m/z$  93 ( $\beta$ -elemene). Citronella grass extract was administered to rats by intragastric administration and intravenous administration (containing  $\beta$ -elemene  $55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), and plasma was collected and prepared using an automated blood collection system. The linear range of  $\beta$ -elemene in plasma was  $1.0\text{--}250 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $r = 0.997$ ), the limit of quantification was  $1.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , the accuracy was  $-4.47\% - -0.85\%$ , the extraction recovery was between  $56.02\%\text{--}66.89\%$ , and no obvious matrix effect ( $94.28\%\text{--}108.63\%$ ) was found. The main pharmacokinetic parameters of  $\beta$ -elemene were  $\text{AUC}_{0-t}$  ( $23.56 \pm 4.40$ )  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $t_{\text{max}}$  ( $1.67 \pm 0.58$ ) h,  $C_{\text{max}}$  ( $7.36 \pm 0.69$ )  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $\text{MRT}_{0-t}$  ( $2.76 \pm 0.27$ ) h,  $t_{1/2z}$  ( $2.73 \pm 1.36$ ) h,  $V_z$  ( $7.39 \pm 3.18$ )  $\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,  $\text{CL}_z$  ( $1.95 \pm 0.51$ )  $\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ , and the absolute bioavailability was about  $8.78\%$ . The method is simple, accurate, and sensitive, and is suitable for the pharmacokinetic analysis of  $\beta$ -elemene in citronella grass extract in rats. All animal studies were implemented according to protocols, which were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences.

**Key words:**  $\beta$ -elemene; pharmacokinetics; liquid-liquid microextraction; GC-MS; citronella grass

香茅为禾本科香茅属植物柠檬草 *Cymbopogon citrates* [DC.] Stapf. 的全草, 以“茅香”之名始载于《本草拾遗》, 又名香茅草。香茅草有疏风通络, 温中止痛、止泻的功效, 临床多用于治疗感冒头身疼痛、风寒湿痹、脘腹冷痛、泄泻、跌打损伤等病症<sup>[1]</sup>。现代药理研究显示, 香茅草具有抗菌、抗炎、镇痛、抗氧化、抗肿瘤、抗焦虑、降压、降血糖等作用<sup>[2]</sup>。近来, 作者等从香茅草中制备获得一种香茅草提取物, 其中含  $\beta$ -榄香烯约  $60\%\text{--}75\%$ <sup>[3]</sup>。含  $\beta$ -榄香烯制剂已用于临床多种癌症的治疗, 和现有化疗药合用, 具有逆转肿瘤耐药和协同增敏的特点<sup>[4]</sup>; 另报道  $\beta$ -榄香烯有抗氧化、抗凝血和抗血栓等作用, 开发前景广阔<sup>[5,6]</sup>。有研究显示  $\beta$ -榄香烯的口服生物利用度较低<sup>[7]</sup>, 但香茅草提取物中  $\beta$ -榄香烯的药代动力学特征尚不清楚。本文采用液液微萃取结合气相色谱-质谱联用 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 方法检测血浆中  $\beta$ -榄香烯的药物浓度, 并用于香茅草提取物在大鼠体内药代动力学特征的研究, 以期对香茅草的新药研发及临床应用提供方法及数据参考。

## 材料与方法

**仪器设备** GC-MS 仪 (美国 Agilent 公司), 配有 7980A 气相系统、7963 自动进样器、5975C 单四极杆检测器和 OpenLab CDS2 数据处理工作站; Easyflow 独立通气笼具 (意大利 Tecniplast 公司); 桌面式麻醉机 (美国 Harvard Apparatus 公司); 小动物自动采血系统 (美国 Instech 公司), 包括 ABS2<sup>TM</sup> 小动物采血仪、ABS2 采血软件、C19PU 股动脉采血管、C19PU 股静脉给药管和 VAH95AB 大鼠血管通道马甲等; Targin VX-III 多管涡旋振荡器 (北京踏锦科技有限公司); Rotanta 460R 高速冷冻离心机 (德国 Hettich 公司)。

**药品与试剂** 香茅草提取物 (批号: 200320, 含  $\beta$ -

榄香烯约  $69.1\%$ ) 和  $\beta$ -榄香烯对照品 (批号: 171102, 纯度大于  $99.9\%$ ), 由石药集团远大 (大连) 制药有限公司制备<sup>[3]</sup>和提供。萘 ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 批号: 19003), 中国计量科学研究院。异氟烷 (批号: 217180801), 深圳市瑞沃德生命科技有限公司。甘油 (批号: 151201), 河北省保定市金钟制药有限公司。肝素钠 (批号: 20120612), 国药集团化学试剂有限公司。硫酸庆大霉素注射液 (批号: 91Y01071), 宜昌人福药业有限责任公司。

**实验动物** 雄性 SD 大鼠, SPF 级,  $6\text{--}7$  周龄, 实验动物质量合格证号 1112512011001913, 购自中国食品药品检定研究院 (许可证号: SCXK (京) 2017-0005)。饲养于独立通气笼具 ( $461 \text{ mm} \times 274 \text{ mm} \times 229 \text{ mm}$ ), 保持实验室环境温度为  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ , 湿度为  $50\%$  左右。所有动物饲养 3 周适应饲养环境, 自由饮水和食用商业饲料。实验给药前, 禁食  $12\text{--}16 \text{ h}$ , 自由饮水。所有动物实验过程和动物关怀均得到中国中医科学院中药研究所伦理委员会的批准。实验后, 所有动物施行安乐死。

**大鼠股动脉和股静脉置管** 大鼠称重后, 麻醉 (异氟烷,  $5\%$  诱导和  $2.5\%$  维持), 将 PU 管植入大鼠左侧股动脉和股静脉中, 然后将管路从大鼠背部引出, 连上大鼠血管通道马甲, 肌内注射硫酸庆大霉素注射液  $0.1 \text{ mL}$ , 恢复性饲养备用。股动脉置管用于自动采血, 股静脉置管用于静脉给药。

**小动物自动采血仪参数设置** 采血体积为  $200 \mu\text{L}$ , 采血及补液速度为  $375 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ , 保持血管畅通模式及速度为  $200 \mu\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ , 低损失模式, 预抽体积为  $5 \mu\text{L}$ , 空气推进量为  $150\%$  样品量, 样品收集室温度为  $4\text{--}6 \text{ }^\circ\text{C}$ 。含  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  肝素的生理盐水用于大鼠采血管的封管, 含  $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  肝素的生理盐水用于大鼠采血过程中的补液。

**GC-MS 检测方法** 色谱柱为 Agilent DB-5ms 色谱柱 ( $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$ ,  $0.25 \mu\text{m}$ ); 载气为高纯度氦气

(>99.5%), 进样口温度为 260 °C; 程序升温梯度洗脱程序 (初始 60 °C; 以 50 °C·min<sup>-1</sup> 的速度升温至 160 °C, 保持 3 min; 之后 260 °C, 保持 3 min; 最后降至 60 °C, 总运行时间为 13 min), 流速为 0.15 mL·min<sup>-1</sup>; 脉冲不分流模式, 脉冲压力 25 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa), 加压时间 0.75 min, 吹扫流量 60 mL·min<sup>-1</sup>, 时间 1 min, 进样量为 2 μL。采用电子轰击离子源 (EI) 电离, 单离子监测 (SIM) 模式扫描, 正离子方式检测。电子轰击能量 70 eV, 离子源温度 230 °C, 四极杆温度 150 °C。选择监测的离子为 *m/z* 128 (内标萘, 监测时间段 2.5~3.5 min) 和 *m/z* 93 ( $\beta$ -榄香烯, 监测时间段 3.5~5.0 min)。

**内标溶液、对照品溶液和质量控制 (QC) 样品的配制** 取萘标准溶液适量, 加适量正己烷逐级稀释, 得到 200 ng·mL<sup>-1</sup> 的内标溶液。精密称取  $\beta$ -榄香烯约 20 mg, 精密称定, 加适量正己烷溶解后定容, 进行逐级稀释, 得到对照品系列溶液, 然后取部分对照品溶液加入一定量的空白血浆混匀制备最低定量限 (limit of quantification, LOQ, 1.0 ng·mL<sup>-1</sup>)、低浓度质控 (LQC, 2.0 ng·mL<sup>-1</sup>)、中浓度质控 (MQC, 40 ng·mL<sup>-1</sup>) 和高浓度质控 (HQC, 240 ng·mL<sup>-1</sup>) 样品, 以上 -80 °C 冰箱中保存备用。

**生物样品前处理** 血浆样品在室温下融化后, 涡旋混匀, 精密吸取 90 μL, 置于 250 μL 圆底玻璃小管中, 加入内标溶液 10 μL, 加入正己烷 50 μL, 3 000 r·min<sup>-1</sup> 涡旋振荡 3 min, 4 °C、2 000 ×g 离心 5 min, 然后取有机层于尖底玻璃小管中, 4 °C、20 000 ×g 离心 10 min, 取上清待测。

**不同体积萃取溶剂对 MS 响应及萃取回收率的影响** 取含  $\beta$ -榄香烯和萘均为 100 ng·mL<sup>-1</sup> 的血浆样品 100 μL, 分别加入 25、50、100、200 和 300 μL 的正己烷 (溶剂-样品体积比分别为 0.25、0.5、1、2 和 3), 按“生物样品前处理”项下方法操作, 另用正己烷配置同等浓度的对照品溶液, 按上述方法测定, 每份样品平行制备 3 份, 考察不同体积萃取溶剂对内标和  $\beta$ -榄香烯 MS 响应和萃取回收率的影响。

#### 方法学考察

**选择性** 取大鼠空白血浆 90 μL, 按“生物样品前处理”项下方法操作, 获得大鼠空白血浆的色谱图; 将内标及 LOQ 浓度的对照品溶液加入大鼠空白血浆中, 依同法操作, 得色谱图; 取受试大鼠给药的血浆样品, 同法操作, 得色谱图, 考察分析方法的选择性。

**线性范围及定量限** 取大鼠空白血浆 90 μL, 加入对照品溶液适量, 配制成相当  $\beta$ -榄香烯质量浓度约为 1、2.5、5、10、25、50、100 和 250 ng·mL<sup>-1</sup> 的模拟生物样品, 按“生物样品前处理”项下方法操作, 按上述方法测

定, 以生物样品中待测药物的浓度 *X*, 待测物与内标的峰面积比值为纵坐标 *Y*, 用加权最小二乘法 (权重系数为 1/*X*) 作直线回归, 求得的回归方程即为标准曲线, 根据信噪比为 10 及连续进样 6 次的 RSD 判定各成分的 LOQ。

**基质效应、准确度与精密度、稳定性** 取空白血浆制备的 LOQ、LQC、MQC 及 HQC 样品, 按“生物样品前处理”项下方法操作, 得到内标和  $\beta$ -榄香烯的色谱峰面积 *A*; 取空白血浆, 按“生物样品前处理”项下方法操作, 正己烷萃取后的上清液加入与上述相应浓度的对照品和内标溶液, 得到内标和  $\beta$ -榄香烯的色谱峰面积 *B*; 取用纯水制备的 LOQ、LQC、MQC 及 HQC 样品, 按“生物样品前处理”项下方法操作, 得到内标和  $\beta$ -榄香烯的色谱峰面积 *C*; *A* 与 *B* 的比值即为提取率, *B* 与 *C* 的比值即为基质效应。LOQ 样品和 QC 样品 1 日之内测定 6 次, 以及连续 3 天测定, 计算日内、日间精密度和准确度。LOQ 样品和 QC 样品处理后在样品室放置 12 h 再次测定, 计算回收率, 分析处理后样品的稳定性。以上所有样品平行制备 6 份。

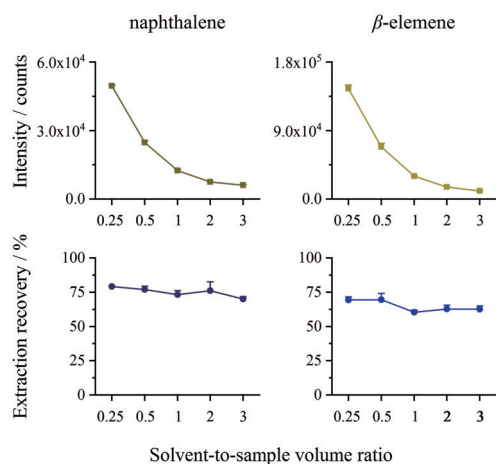
**药代动力学及生物利用度研究** 大鼠随机分为香茅草提取物灌胃给药组和静脉注射给药组, 每组 6 只。香茅草提取物组用甘油-生理盐水溶剂 (含甘油 10% 和生理盐水 90%) 制备, 按提取物 80 μL·kg<sup>-1</sup> 大鼠 (含  $\beta$ -榄香烯 55 mg·kg<sup>-1</sup>) 灌胃 (每只大鼠 2.5 mL) 和股静脉注射 (每只大鼠 1.0 mL) 给药。大鼠给药后 5、10、15、30 min 及 1、2、3、4、6、8、10、12、16、20 和 24 h, 用小动物自动采血仪收集全血 (约 200 μL) 于 0.5 mL 的 ETDA·K<sub>2</sub> 抗凝管中, 4 °C、2 000 ×g 离心 15 min, 取上清血浆, 于 -80 °C 冻存。另取 6 只空白大鼠, 按上述方法制备大鼠空白血浆样品。

**数据分析** 药代参数采用 DAS 软件 (版本 3.0, 上海博佳医药科技有限公司) 的非房室模型计算。最大血药浓度 (*C*<sub>max</sub>) 和达峰时间 (*t*<sub>max</sub>) 均为实测值, 时间浓度曲线下面积 (AUC) 采用梯形法计算。数据以均值 ± 标准差形式表示。统计学分析用方差分析及非参数检验, *P* < 0.05 有统计学意义, *P* < 0.01 有显著统计学意义。数据处理和绘图软件为 Origin Pro 2019 (版本 9.6.5.169, 美国 OriginLab 公司)。

## 结果

### 1 液液微萃取方法提高样品检测的灵敏度

不同体积萃取溶剂对血浆中内标萘和  $\beta$ -榄香烯 MS 响应及萃取回收率的影响, 结果见图 1。可知, 随着正己烷体积的减少, 内标萘和  $\beta$ -榄香烯的 MS 响应快速升高, 而萃取回收率内标稳定在 75% 左右,  $\beta$ -榄香



**Figure 1** Effect of organic solvent-to-plasma volume ratio on the MS intensity and extraction recovery for  $\beta$ -elemene and internal standard (naphthalene) in rat plasma samples

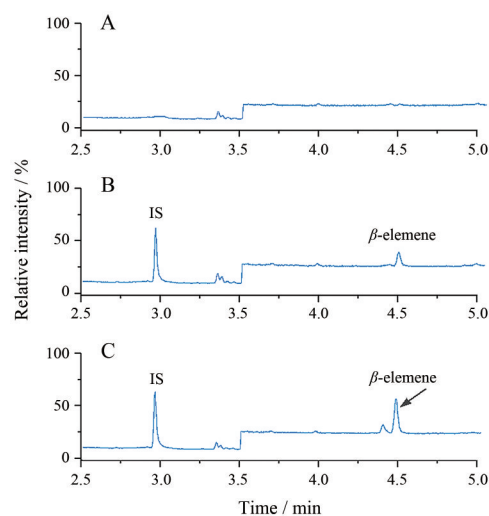
烯在 60%~69% 之间, 这说明微小体积的萃取溶剂也能实现对血浆中内标和  $\beta$ -榄香烯的充分和稳定萃取。因此, 在减少检测系统污染的前提下, 为尽可能增加  $\beta$ -榄香烯 MS 响应, 提高样品检测的灵敏度, 本文选择萃取溶剂和血浆比为 0.5, 即液液微萃取的前处理方法, 以萘为内标进行血浆中  $\beta$ -榄香烯的提取。

## 2 方法学验证

**2.1 方法的选择性** MS 扫描结果显示  $\beta$ -榄香烯的分子离子峰为 204, 基峰为 93, 内标萘的分子离子峰和基峰均为 128, 因此选择 93 和 128 离子监测  $\beta$ -榄香烯和内标萘。经过 GC 的分离,  $\beta$ -榄香烯在大鼠血浆中的色谱图如图 2 所示, 可知本方法  $\beta$ -榄香烯和内标的峰形及分离效果良好,  $\beta$ -榄香烯的出峰时间约为 4.50 min, 内标的出峰时间约为 3 min, 大鼠血浆中的内源性物质、代谢产物等不干扰以上物质的检出。

**2.2 线性范围与定量限** 血浆中  $\beta$ -榄香烯的线性范围为 1.0~250 ng·mL<sup>-1</sup>。典型的标准曲线回归方程为  $Y = 2.7658X + 0.2354$  ( $r = 0.9970$ ), 按信噪比 10 和连续进样 6 次 RSD 小于 15% 的 LOQ 为 1.0 ng·mL<sup>-1</sup>。

**2.3 提取率与基质效应** 血浆中  $\beta$ -榄香烯的提取率和基质效应结果见表 1, 提取率在 56.02%~66.89% 之间, 基质效应为 94.28%~108.63%。



**Figure 2** GC-MS chromatograms of  $\beta$ -elemene in blank plasma samples (A), blank plasma samples spiked with internal standard (IS, naphthalene) and standard (LOQ, 1 ng·mL<sup>-1</sup>) (B), and plasma samples obtained 4 h after intragastric administration of citronella grass extract in rats (C)

**2.4 精密度、准确度与稳定性** 血浆中  $\beta$ -榄香烯检测的准确度, 仪器的日内、日间精密度及稳定性结果见表 1, 可知准确度在 -4.47% ~ -0.85% 以内, 日内和日间精密度均在 12% 以内, 表明样品前处理方法准确、稳定可行。处理后的样品放置 12 h 的回收率在 91.86%~105.46% 以内, 表明样品处理后稳定性良好。

## 3 药代动力学及生物利用度

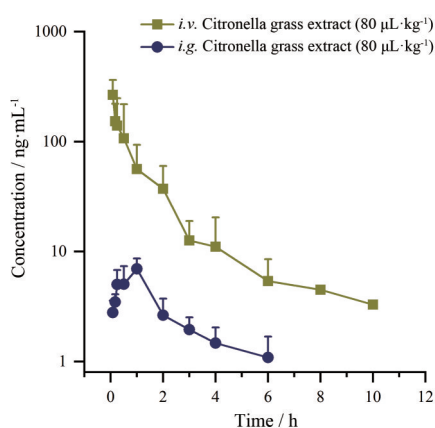
大鼠灌胃静脉注射香茅草提取物 ( $\beta$ -榄香烯 55 mg·kg<sup>-1</sup>),  $\beta$ -榄香烯的平均药时曲线见图 3, 主要药代动力学参数见表 2。灌胃香茅草提取物大鼠血浆中  $\beta$ -榄香烯达峰速度较快, 约在 1.67 h 达峰, 浓度为 7.36 ng·mL<sup>-1</sup>, 而静脉注射的峰浓度是其 30 多倍 ( $P < 0.01$ ); 半衰期约为 2.73 h, 清除速度较快约 1.95 L·h<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>, 表观分布容积较大约 7.4 L·kg<sup>-1</sup>, 体内滞留时间短约 2.76 h, 绝对生物利用度约为 8%。大鼠口服香茅草提取物后  $\beta$ -榄香烯的药代动力学性质不佳, 生物利用度较低。

## 讨论

关于生物样品中  $\beta$ -榄香烯的分析方法有气相色谱

**Table 1** Extraction efficacy, matrix effect, accuracy, precision and stability results of  $\beta$ -elemene in rat plasma ( $n = 6$ ). LOQ: Limit of quantification; LQC: Low concentration quality control; MQC: Medium concentration quality control; HQC: High concentration quality control

Sample	Extraction efficacy/%	Matrix effect/%	Accuracy/%	Inter-day precision/%	Intra-day precision/%	Post-preparation stability/%
LOQ	56.02	94.28	-4.47	2.66	11.95	91.86
LQC	66.89	108.63	-0.85	8.92	6.87	103.40
MQC	56.10	95.23	-1.33	3.92	6.69	104.84
HQC	62.55	94.30	-3.21	7.47	6.58	105.46



**Figure 3** Mean plasma concentration-time curves of  $\beta$ -elemene after intragastric and intravenous administration of citronella grass extract at dosage of  $80 \mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$  in rats.  $n = 6, \bar{x} \pm s$

**Table 2** Pharmacokinetics parameters of  $\beta$ -elemene after intragastric and intravenous administration of citronella grass extract at dosage of  $80 \mu\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$  in rats.  $n = 6, \bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs iv

Parameter	Citronella grass extract	
	ig	iv
$C_{\max}$ or $C_{5\text{min}}$ / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$7.36 \pm 0.69^{**}$	$266.62 \pm 97.34$
$t_{\max}$ / h	$1.67 \pm 0.58$	–
$\text{AUC}_{0-t}$ / $\text{h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$23.56 \pm 4.40^{**}$	$268.37 \pm 136.04$
$\text{AUC}_{0-\infty}$ / $\text{h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$26.91 \pm 7.02^{**}$	$277.70 \pm 131.04$
$\text{MRT}_{0-t}$ / h	$2.76 \pm 0.27^{**}$	$1.16 \pm 0.42$
$t_{1/2z}$ / h	$2.73 \pm 1.36$	$2.00 \pm 0.96$
$V_z$ / $\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	$7.39 \pm 3.18^{**}$	$0.63 \pm 0.39$
$\text{CL}_z$ / $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	$1.95 \pm 0.51^{**}$	$0.22 \pm 0.11$
$F$ / %	$8.78 \pm 1.64$	–

谱法<sup>[8]</sup>、高效液相色谱法<sup>[9]</sup>等。最近,也有用 GC-MS 方法检测血浆中  $\beta$ -榄香烯的报道<sup>[10,11]</sup>。这些分析方法的样品前处理操作大都是液液萃取技术,特点是需大量的萃取溶剂、加入饱和盐、多次提取以及溶剂吹干等复杂的前处理操作,分析方法的定量限最低的仅为  $31.25 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ <sup>[10]</sup>。因此,为深入了解香茅草提取物的药代动力学特征,亟需建立简单、灵敏和准确的  $\beta$ -榄香烯血药浓度分析方法。

液液微萃取技术是基于两相溶剂不相容的原理,使待测物质转移到较少的萃取溶剂中,和传统使用 3~10 倍体积萃取溶剂的方法相比,液液微萃取不仅能节省大量有机溶剂,减少繁琐的前处理操作,还能使样品得到富集,提高样品检测的灵敏度<sup>[12]</sup>。应用液液微萃取技术进行生物样品的前处理已有相关报道,如用于中药冰片中龙脑、异龙脑、樟脑等挥发性化合物的提取,槲皮素、银杏内酯 A 等非挥发性化合物的提取等等<sup>[13,14]</sup>。而液液微萃取用于生物样品中  $\beta$ -榄香烯提取的研究尚未见报道。本文基于液液微萃取技术,使用 0.5 倍血浆体积的正己烷对血浆中  $\beta$ -榄香烯进行提取和富集;并

且优化了 GC 的进样体积 (脉冲进样  $2 \mu\text{L}$  峰型较好,而  $3 \mu\text{L}$  时峰型较差),提高了样品检测的灵敏度,最终使  $\beta$ -榄香烯检测的 LOQ 低至  $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,和文献相比提高了 30 倍<sup>[10]</sup>。但使用液液微萃取技术制备的样品,需注意 MS 基质效应以及系统耐用性分析等,本研究未见明显的基质效应影响,进样分析约 300 个样品,未见明显的柱效降低现象。

本文建立的  $\beta$ -榄香烯的 GC-MS 分析方法,经验证符合生物样品分析方法指导原则的要求<sup>[15]</sup>,可满足大鼠灌胃香茅草提取物后血浆中较低浓度  $\beta$ -榄香烯的样品检测 ( $C_{\max}$  低于  $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),完整绘制了血浆中  $\beta$ -榄香烯的药时曲线,成功用于香茅草提取物中  $\beta$ -榄香烯的药代动力学特征研究。口服香茅草提取物大鼠血浆中  $\beta$ -榄香烯的主要药代学参数,如表观分布容积为  $(3.8 \sim 9.8) \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,远大于大鼠的体液体积  $(0.67 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1})$ <sup>[16]</sup>,说明  $\beta$ -榄香烯在大鼠体内分布广泛,这已有组织分布的实验结果证实<sup>[17]</sup>。血浆中消除快 (半衰期为  $2.73 \text{ h}$ ),生物利用度低 (小于 10%)。文献表明  $\beta$ -榄香烯的溶解度不好,测定的油水分配系数 ( $\text{Log}P$ ) 较大 ( $\text{Log}P = 2.29 \sim 2.69$ )<sup>[18]</sup>,不易透过 Caco-2 单层细胞膜<sup>[19]</sup>,在体内可发生生物转化<sup>[17]</sup>,以上可能是其生物利用度低的主要原因。同样,结果也提示香茅草提取物的进一步开发需注意  $\beta$ -榄香烯的生物利用度。目前,为提高  $\beta$ -榄香烯口服生物利用度的香茅草提取物的滴丸、肠溶滴丸及纳米脂质体等制剂正在研究开发阶段<sup>[20]</sup>。

总之,基于液液微萃取结合 GC-MS 的方法简便、准确,灵敏度高,适用于香茅草提取物中  $\beta$ -榄香烯在大鼠体内的药代动力学特征和生物利用度研究,也可为后期香茅草提取物制剂和其他含  $\beta$ -榄香烯制剂的研究提供方法参考。

**作者贡献:** 杨伟鹏和李涛提供了研究思路,所有作者参与了本研究的设计,李涛收集和分析了大部分数据并撰写了论文,李涛和杨伟鹏讨论了研究结果并修订了论文。

**利益冲突:** 无任何利益冲突。

## References

- [1] Chinese Materia Medica Editorial Board of National Administration of Traditional Chinese Medicine. Chinese Materia Medica (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1999: 335-337.
- [2] Xiang JM, Zheng XL, Wei JH, et al. Research progress in *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf and lemongrass tea [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol (世界科学技术-中医药现代化), 2017, 19: 874-879.
- [3] Xu H, Feng Z. Anticancer drug elemene and its preparation

- method: CN, 1413580A [P]. 2003-04-30.
- [4] Zhang WZ, Huang XX, Chen B, et al. Combination of Chinese and western medicine to prevent and reverse resistance of cancer cells to anticancer drugs [J]. *Chin Sci Bull (科学通报)*, 2020, 65: 1845-1856.
- [5] Huo WM, Duan WL, Liu J, et al. Studies on the anticoagulant and antithrombotic effects of  $\beta$ -elemene [J]. *Asia-Pacific Tradit Med (亚太传统医药)*, 2013, 9: 30-33.
- [6] Mao LF, Huo WM, Liu J, et al. Study on the antioxidant effects of  $\beta$ -elemene [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学与治疗学)*, 2012, 17: 727-731.
- [7] Wang K, Su CY. Pharmacokinetics and disposition of  $\beta$ -elemene in rats [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2000, 35: 725-728.
- [8] Wang K, Su CY. Determination of  $\beta$ -elemene in biological specimens by gas chromatography [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 1998, 18: 394-395.
- [9] Wang YZ, Zheng JX, Deng YH, et al. Determination of  $\beta$ -elemene in mouse tumor by HPLC [J]. *Chin Hosp Pharm J (中国医院药学杂志)*, 2007, 27: 1246-1248.
- [10] Chen ZH, Song YX, Che JJ, et al. Validation of a sensitive gas chromatographic-mass spectrometric method for the simultaneous determination of  $\beta$ -elemene and  $\beta$ -elemenal in human plasma [J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877: 408-414.
- [11] Li J, Liu WJ. Determination of plasma concentration of  $\beta$ -elemene in *Curcuma zedoaria* by GC-MS and its pharmacokinetic study in rats [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2019, 39: 846-851.
- [12] Soares da Silva Burato J, Vargas Medina DA, de Toffoli AL, et al. Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques [J]. *J Sep Sci*, 2020, 43: 202-225.
- [13] Seidi S, Rezazadeh M, Yamini Y. Pharmaceutical applications of liquid-phase microextraction [J]. *Trends Anal Chem*, 2018, 108: 296-305.
- [14] Cheng C, Liu XW, Du FF, et al. Sensitive assay for measurement of volatile borneol, isoborneol, and the metabolite camphor in rat pharmacokinetic study of *Borneolum* (Bingpian) and *Borneolum syntheticum* (synthetic Bingpian) [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34: 1337-1348.
- [15] Chinese Pharmacopoeia Commission. Guiding Principles for Quantitative Analysis of Biological Samples [S] // Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Vol IV. 2020 Ed. Beijing: China Medicine Science and Technology Press, 2020: 466-472.
- [16] Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans [J]. *Pharm Res*, 1993, 10: 1093-1095.
- [17] Wang K, Li Z, Chen YR, et al. The disposition, metabolism, and pharmacokinetics of a novel anti-tumor agent,  $\beta$ -elemene, in Sprague-Dawley rats [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2005, 26: 301-307.
- [18] Wang XM, Deng YJ, Zhao CJ, et al. Determination of the oil-water partition coefficients of  $\beta$ -elemene [J]. *J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报)*, 2005, 22: 289-290, 320.
- [19] Leng W, Zheng Y, Li SP, et al. Study on absorption mechanisms of zedoary turmeric oil by Caco-2 cell model [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2007, 42: 1228-1232.
- [20] Feng X, Xu JY, Yao H, et al. A new elemene nano-liposome and its preparation method: CN, 111358757A [P]. 2020-07-03.