

# 三七皂苷 R<sub>1</sub> 脑、血液微透析探针的体内外回收率分析

陈腾飞, 刘建勋\*, 姚明江, 宋文婷, 林力

(中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 中药药理北京市重点实验室, 北京 100091)

**[摘要]** **目的:**建立三七皂苷 R<sub>1</sub> 脑、血液微透析探针的体内外回收率的测定方法,考察流速、药物质量浓度、探针使用次数对回收率的影响,并进行探针回收率体内稳定性研究,为三七皂苷 R<sub>1</sub> 的后续研究提供依据。**方法:**采用正透析法和反透析法进行三七皂苷 R<sub>1</sub> 脑、血液微透析探针体内、体外回收率的研究,采用 LC-MS/MS 测定微透析液中三七皂苷 R<sub>1</sub> 的质量浓度,计算探针回收率。**结果:**在流速为 1.5 μL·min<sup>-1</sup>时,三七皂苷 R<sub>1</sub> 脑、血液探针体内回收率在 10 h 内保持稳定,平均回收率分别为 14.0% 和 33.2%;恒定质量浓度下,探针体内外回收率均随着流速(0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 μL·min<sup>-1</sup>)的增加而减小,脑、血液探针的体外正透析法测得的回收率分别为(36.0 ± 1.7)%, (23.5 ± 1.6)%, (14.2 ± 0.5)%, (8.0 ± 0.7)%, (5.4 ± 0.5)% 和(61.6 ± 2.6)%, (48.0 ± 4.1)%, (33.0 ± 2.8)%, (24.1 ± 1.2)%, (18.9 ± 1.1)%, 正、反透析法所测得的探针体外回收率一致,且体内和体外回收率结果也一致;恒定流速下,三七皂苷 R<sub>1</sub> 质量浓度(50, 200, 500, 1 000 μg·L<sup>-1</sup>)对脑、血探针回收率均无影响;使用 ≤ 3 次的探针,经过恢复处理后,仍能够保持较高的回收率。**结论:**反透析法测定的体外回收率与体内回收率一致,且与正透析法测定的体外回收率一致,说明反透析法能够作为研究三七皂苷 R<sub>1</sub> 回收率的测定方法;探针体内回收率在 10 h 内保持稳定,说明微透析技术能够用于三七皂苷 R<sub>1</sub> 脑细胞间液药代动力学、血液药代动力学的同步研究。

**[关键词]** 三七皂苷 R<sub>1</sub>; 微透析; 探针回收率; 药代动力学; 液相色谱-串联质谱法

**[中图分类号]** R283.6; R969.1; R284.1; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)15-0035-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017150035

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170511.0901.010.html>

**[网络出版时间]** 2017-05-11 9:01

## Analysis of *in Vitro* and *in Vivo* Recovery of Brain and Blood Microdialysis Probe of Notoginsenoside R<sub>1</sub>

CHEN Teng-fei, LIU Jian-xun\*, YAO Ming-jiang, SONG Wen-ting, LIN Li

(Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Institute of Basic Medical Sciences, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a measuring method for *in vitro* and *in vivo* recovery of microdialysis probe of notoginsenoside R<sub>1</sub> and to investigate the effect of flow rate, drug concentration and usage count of probe on recovery, then *in vivo* stability of probe recovery was investigated. **Method:** Dialysis method and retrodialysis method were used for this study. The concentration of notoginsenoside R<sub>1</sub> in brain and blood dialysate was determined by LC-MS/MS and the probe recovery was calculated. **Result:** The recovery of brain and blood microdialysis probe showed a good stability within 10 h, the average recoveries of brain and blood probe when flow velocity at 1.5 μL·min<sup>-1</sup> for notoginsenoside R<sub>1</sub> were 14.0% and 33.2%, respectively. At the same concentration, the *in vitro* and *in vivo* recoveries of brain and blood probe of notoginsenoside R<sub>1</sub> decreased with the

**[收稿日期]** 20170216(006)

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2015-CB554405);中国中医科学院科技创新团队项目(YS1303);国家自然科学基金面上项目(81673587)

**[第一作者]** 陈腾飞, 博士后, 从事药代动力学研究, Tel:010-62835618, E-mail: flychen04@126.com

**[通讯作者]** \*刘建勋, 研究员, 博士生导师, 从事中药药理学研究, Tel:010-62875601, E-mail: jianxun\_liu@163.com

increase of flow rate (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ). The dialysis recoveries of brain and blood probe *in vitro* were (36.0  $\pm$  1.7)%, (23.5  $\pm$  1.6)%, (14.2  $\pm$  0.5)%, (8.0  $\pm$  0.7)%, (5.4  $\pm$  0.5)% and (61.6  $\pm$  2.6)%, (48.0  $\pm$  4.1)%, (33.0  $\pm$  2.8)%, (24.1  $\pm$  1.2)%, (18.9  $\pm$  1.1)%, respectively. Recoveries of dialysis and retrodialysis *in vitro* were approximately equal, and the recovery detected by retrodialysis *in vivo* was similar with the *in vitro* results. Concentrations (50, 200, 500, 1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) had no obvious effect on recovery at constant flow rate. Probe which used no more than 3 times could still keep high transmittance by syringe with 2% heparin sodium and ultrapure water successively. **Conclusion:** Retrodialysis method can be used to study probe recovery of notoginsenoside R<sub>1</sub>, and microdialysis can be used for pharmacokinetic study of notoginsenoside R<sub>1</sub>.

[**Key words**] notoginsenoside R<sub>1</sub>; microdialysis; probe recovery; pharmacokinetics; LC-MS/MS

微透析是从神经化学领域发展起来的,可在不破坏生物体内环境的前提下,对靶器官或组织的内源性和外源性物质进行实时取样的一种技术<sup>[1-2]</sup>。该技术以透析原理为基础<sup>[3-4]</sup>,通过将微透析针植入靶器官或组织,采用微量注射泵灌注灌流液,利用半透膜两侧物质的浓度差,实现样品采集;因为蛋白质、酶等大分子无法透过半透膜,所以收集的样品可以不经预处理直接进行定量、定性分析<sup>[5]</sup>。

三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* 的干燥根和根茎,到目前为止已从三七中分离到多种皂苷类成分<sup>[6-8]</sup>。三七皂苷 R<sub>1</sub> 是从三七根茎中提取到的一种特有活性成分,具有保护心肌和心血管<sup>[9-10]</sup>、防治缺血再灌注损伤<sup>[11-12]</sup>、保护神经<sup>[13]</sup>、抗炎<sup>[14]</sup>及抗癌<sup>[15]</sup>等作用。将微透析技术用于研究药物在靶器官和组织的动力学已经成为一个新的研究热点。目前对三七皂苷 R<sub>1</sub> 微透析探针回收率的研究较少。吕耿彬等<sup>[16]</sup>建立了三七皂苷 R<sub>1</sub> 经皮给药微透析体外回收率的研究方法;文献<sup>[17-18]</sup>报道了三七皂苷 R<sub>1</sub> 脑微透析探针回收率的相关研究,但均是在系统地研究其他成分回收率的基础上,直接测定了特定流速下三七皂苷 R<sub>1</sub> 的回收率。本实验采用正透析法和反透析法分别对三七皂苷 R<sub>1</sub> 脑、血微透析探针的体内外回收率进行研究,考察流速、药物质量浓度、探针使用次数等因素对回收率的影响,并考察探针体内回收率的稳定性,为进一步研究三七皂苷 R<sub>1</sub> 的脑细胞间液药代动力学及其与血液药代动力学的相关性提供数据参考。

## 1 材料

API 4000 Q-TRAP 型三重四极杆串联质谱仪(美国 Applied Biosystem 公司,配有 Turbo V<sup>TM</sup> 离子源仓,离子喷雾和大气压电离离子源,Analysis 1.4.2 数据处理系统),Symbiosis<sup>TM</sup> Pico 型在线固相萃取 SPE-LC 联用系统(荷兰 Spark Holland 公司),

68001 型大鼠立体定位仪(美国 Stoelting 公司),AG-245 型电子分析天平(美国 Mettler-Toledo 公司),MS1 Minishaker 型涡流混合器(德国 IKA 公司);CMA 12/4 mm 型微透析探针及探针套管,CMA 20 Elite 10 mm 3/pkg 型血液微透析探针,CMA 402 型微透析泵和 MAB 85 型低温微量收集器(瑞典 CMA 公司)。

三七皂苷 R<sub>1</sub> 对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110745-201318,纯度 94%),玻璃离子体水门汀(上海医疗器械股份有限公司),复方氯化钠注射液(林格氏液,华润双鹤药业股份有限公司,批号 D201407173,规格 500 mL),肝素钠注射液(临用前用生理盐水配成体积分数 2% 的溶液,常州千红生化制药股份有限公司,批号 150911,规格 2 mL/12 500 单位),水为娃哈哈饮用纯净水,甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯,其他试剂均为市售分析纯。

SPF 级 SD 雄性大鼠,体重 230 ~ 270 g,购自斯贝福(北京)实验动物科技有限公司,合格证号 SCXK(京)2011-0004。本实验均符合北京实验动物福利伦理审查指南的相关要求。

## 2 方法与结果

### 2.1 检测条件

**2.1.1 色谱条件** 采用 Waters Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相[水-甲醇-乙腈(9:0.5:0.5),含 0.01% 甲酸](A)-[甲醇-乙腈(1:1),含 0.01% 甲酸和 1% 水](B)梯度洗脱(0 ~ 0.2 min, 63% A; 0.2 ~ 1.0 min, 63% ~ 30% A; 1.0 ~ 4.8 min, 30% A; 4.8 ~ 6.8 min, 30% ~ 63% A),流速设定 0.23 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>,柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ 。

**2.1.2 质谱条件** 离子喷射电压 5.5 kV,源内温度 550  $^{\circ}\text{C}$ ,气帘气体压力 103.4 kPa,源内气体压力 1 为 275.8 kPa,源内气体压力 2 为 344.7 kPa,正离子检测,多反应检测(MRM)模式进行质谱分析,用

于三七皂苷  $R_1$  定量的离子通道为  $m/z$  955.6 ~ 775.6。

## 2.2 溶液的配制与测定

**2.2.1 对照品溶液** 称取三七皂苷  $R_1$  对照品约 4 mg, 置 1.5 mL 离心管中, 精密加入甲醇 1 mL 溶解后, 涡旋混匀, 得相应质量浓度的三七皂苷  $R_1$  甲醇溶液, 取该溶液适量用甲醇稀释, 使三七皂苷  $R_1$  质量浓度达  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。精密量取  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  三七皂苷  $R_1$  甲醇溶液 100  $\mu\text{L}$ , 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 得  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  三七皂苷  $R_1$  溶液, 用甲醇将此溶液依次稀释成三七皂苷  $R_1$  质量浓度分别为 5 000, 4 000, 1 000, 250, 120, 40  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品储备液, 临用前分别以林格氏液将上述 6 个质量浓度的对照品储备液稀释 10 倍, 得质量浓度分别为 500, 400, 100, 25, 12, 4  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的三七皂苷  $R_1$  对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液** 称取三七皂苷  $R_1$  对照品 5 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加林格氏液溶解后定容至刻度, 得  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  三七皂苷  $R_1$  溶液, 再用林格氏液将其稀释成质量浓度分别为 1 000, 500, 200, 100, 50  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的微透析试验用三七皂苷  $R_1$  溶液, 临用前新鲜配制。

**2.2.3 样品处理** 取一定体积的对照品溶液、微透析试验用三七皂苷  $R_1$  溶液及微透析样品, 各分别加入等体积的 40% 甲醇, 涡旋混匀后进样 10  $\mu\text{L}$ 。

**2.3 标准曲线、精密度和准确度考察** 取质量浓度为 4, 12, 25, 100, 400, 500  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的三七皂苷  $R_1$  对照品溶液, 按 2.2.3 项下方法处理后依次进样, 以各成分的峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 按  $(1/X^2)$  加权线性回归, 结果得三七皂苷  $R_1$  回归方程  $Y = 1\,080X - 92.7$  ( $r = 0.9988$ ), 线性范围 4 ~ 500  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取三七皂苷  $R_1$  低、中、高 3 个质量浓度 (12, 100, 400  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的对照品溶液, 样品处理后进样分析, 1 d 内连续进样 6 次, 计算日内精密度和准确度 (RE); 连续测定 3 d, 计算日间精密度和准确度, 结果见表 1。

表 1 三七皂苷  $R_1$  的精密度和准确度试验 ( $n = 6$ )

| 质量浓度<br>$/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | 日内  |     | 日间  |     |
|--|-----|-----|-----|-----|
|  | RSD | RE  | RSD | RE  |
| 12   | 6.8 | 2.2 | 6.4 | 0.2 |
| 100  | 4.2 | 2.6 | 4.1 | 2.6 |
| 400  | 2.9 | 5.6 | 3.3 | 4.1 |

## 2.4 脑、血液微透析探针的植入

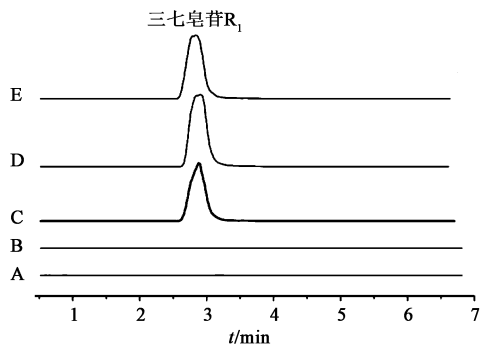
**2.4.1 脑微透析探针的植入** 大鼠腹腔注射 4% 水合氯醛麻醉后, 备皮, 切开头部凶门附近的皮肤, 钝性分离皮下组织并擦净, 暴露骨面。使用立体定位仪固定大鼠的头部, 找出纹状体对应的点 (前凶前后 + 0.05 cm, 中缝左右 - 0.30 cm, 颅骨平面上下 - 0.40 cm) 并用牙科钻打孔, 在钻孔点植入脑微透析探针套管, 另钻两孔拧入螺丝钉, 用牙科水泥将套管连同 2 个螺钉一并固定。待牙科水泥牢固后, 松开立体定位仪, 洒入少量注射用青霉素钠粉末, 手术区域前后各缝皮 1 针。术后观察 24 h, 正常进食进水。微透析试验前先将微透析探针置于水中浸泡约 30 min, 以林格氏液或者一定质量浓度的微透析用三七皂苷  $R_1$  溶液灌流, 排出气泡; 取出已植入探针套管的假针, 小心插入准备好的微透析探针, 以一定的灌流速度开始微透析<sup>[19]</sup>。

**2.4.2 血液微透析探针植入** 将血液探针置于水中浸泡约 30 min 后, 置于 2% 肝素钠溶液中, 设定以  $2 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速灌流 2% 肝素钠约 30 min。大鼠腹腔注射 4% 水合氯醛麻醉后, 在腹部中线靠左约 0.5 cm 和锁骨附近, 备皮, 纵向剪口约 1.5 cm, 找出并钝性分离颈静脉, 结扎远心端, 在远心端剪一小口, 将血液探针朝心脏方向插入约 2.4 cm, 与两旁的肌肉组织缝合以固定探针, 缝皮; 以  $2 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速灌流 2% 肝素钠溶液约 30 min, 之后灌流液更换为林格氏液或者一定浓度的微透析用三七皂苷  $R_1$  溶液, 以一定的灌流速度开始微透析<sup>[20]</sup>。

**2.5 专属性试验** 大鼠植入脑、血液微透析探针并开始微透析, 分别以  $1.5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速灌流林格氏液, 各自平衡 60 min 后, 收集空白脑、血液微透析液, 之后分别灌流质量浓度 100  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的微透析试验用三七皂苷  $R_1$  溶液, 各自平衡 60 min, 收集脑、血液微透析液。样品处理后进行测定, 见图 1。结果表明三七皂苷  $R_1$  的峰形良好, 保留时间约 2.9 min, 脑、血液空白透析液中均未见影响三七皂苷  $R_1$  测定的干扰物。

**2.6 脑、血液微透析探针回收率试验** 微透析探针回收率的研究有 2 种常用的测定方法, 即正透析法和反透析法, 正透析法能够反映透析针的真实回收率, 反透析法则用于评价体内回收率和真实回收率的一致性<sup>[21]</sup>。

**2.6.1 微透析探针体内回收率的稳定性考察** 采用反透析法对探针体内回收率的稳定性进行考察。植入脑、血液微透析探针后, 均以  $1.5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  的



A. 空白脑微透析液; B. 空白血液微透析液; C. 对照品; D. 含药脑微透析液; E. 含药血液微透析液

图 1 大鼠微透析样品及对照品溶液中三七皂苷  $R_1$  的 LC-MS/MS  
Fig. 1 LC-MS/MS chromatograms of microdialysis samples of notoginsenoside  $R_1$  and reference solution

流速灌流质量浓度  $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的微透析用三七皂苷  $R_1$  溶液, 平衡 60 min 后开始收集, 每 60 min 为 1 份样品, 共收集 10 h, 样品经处理后分别测定微透析液和原药液中三七皂苷  $R_1$  浓度, 依次记为  $C_{\text{透析}}$  和  $C_0$ , 按  $(C_0 - C_{\text{透析}}) / C_0 \times 100\%$  计算反向回收率, 见图 2。结果表明脑、血液微透析探针对三七皂苷  $R_1$  的体内回收率在 10 h 内保持相对稳定, 脑探针、血液探针对三七皂苷  $R_1$  的体内平均反向回收率分别为 14.0% 和 33.2%。微透析探针的透过率与透析膜的表面积成正比, 而血液微透析探针的半透膜长度 10 mm, 脑微透析探针的半透膜长度 4 mm, 因此, 相同灌流速度下, 血液微透析探针的体内、体外回收率均大于脑微透析探针。

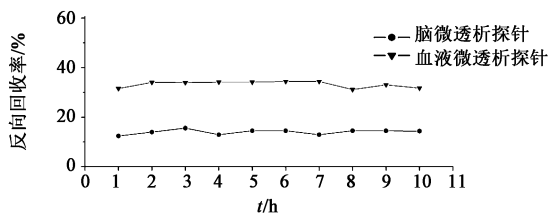


图 2 脑、血液微透析探针对三七皂苷  $R_1$  体内回收率的稳定性考察  
Fig. 2 Effect of brain and blood microdialysis probe on stability of *in vivo* recovery of notoginsenoside  $R_1$

**2.6.2 灌流速度对探针体内外回收率的影响** 分别采用正透析法和反透析法测定并计算三七皂苷  $R_1$  脑、血液微透析探针的体外回收率。正透析法为将脑、血探针分别置于质量浓度  $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的微透析用三七皂苷  $R_1$  溶液中, 恒温  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 分别以 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0  $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速灌注林格氏液, 每个流速在平衡 60 min 后收集样品 5 份, 每份  $30 \mu\text{L}$ , 样品经处理后测定微透析液和原药液中三七皂苷  $R_1$  浓度, 分别记为  $C_{\text{透析}}$  和  $C_0$ , 按  $C_{\text{透析}} / C_0 \times$

100% 计算正向回收率, 见图 3。反透析法为将脑、血探针分别置于林格氏液中, 恒温  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 分别以 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0  $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速灌注质量浓度  $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的微透析用三七皂苷  $R_1$  溶液, 每个流速在平衡 60 min 后收集样品 5 份, 每份  $30 \mu\text{L}$ , 各样品经处理后测定, 计算反向回收率, 见图 3。

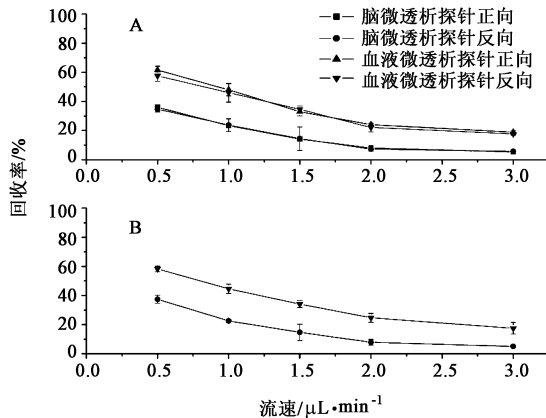


图 3 灌流速度对脑、血液微透析探针体外回收率 (A) 和体内回收率 (B) 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Fig. 3 Effect of different flow rate on *in vitro* (A) and *in vivo* (B) recovery of brain and blood microdialysis probe ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

采用反透析法考察流速对三七皂苷  $R_1$  脑、血液微透析探针体内回收率的影响。按 2.4 项下方法植入脑、血液微透析探针并平衡后, 分别以 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0  $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速灌注  $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的微透析用三七皂苷  $R_1$  溶液, 每个流速在平衡 60 min 后收集样品 5 份, 每份  $30 \mu\text{L}$ , 样品处理后进行测定, 计算反向回收率, 见图 3。结果发现随着流速的增加, 三七皂苷  $R_1$  脑、血液微透析探针的正向和反向体外回收率均减小; 反向体内回收率也与流速成反比, 流速越大, 回收率越低。同一类型的微透析探针, 反透析法测得的体内、体外回收率基本相同, 而正透析法、反透析法测定的体外回收率也基本一致, 说明通过反透析法测定的回收率能够用于推测靶器官内药物的真实质量浓度。

**2.6.3 质量浓度对探针体外回收率的影响** 采用正透析法考察质量浓度对三七皂苷  $R_1$  脑、血液微透析探针回收率的影响。将探针置于一定质量浓度 ( $50, 200, 500, 1\ 000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的微透析用三七皂苷  $R_1$  溶液中, 恒温  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 以恒定的灌流速度 (设定  $1.5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 灌流林格氏液, 每个质量浓度在平衡 60 min 后开始收集样品, 各 5 份, 每份  $30 \mu\text{L}$ , 样品处理后进行测定, 计算反向回收率, 见图 4。结果发现当流速不变时, 在 4 种不同质量浓度的三七皂苷  $R_1$  溶液中测得的脑、血液微透析探针回收率基本相

似,说明在  $50 \sim 1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,脑、血液微透析探针的回收率与质量浓度无关。

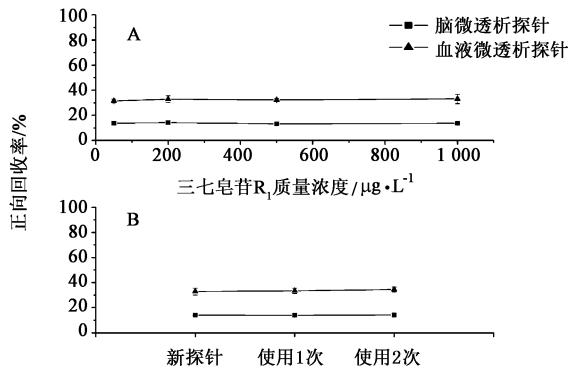


图 4 质量浓度(A)和使用次数(B)对脑、血液微透析探针体外回收率的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig. 4 Effect of different concentration (A) and usage count (B) on *in vitro* recovery of brain and blood microdialysis probe ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

**2.6.4 探针使用次数对体外回收率的影响** 选择灌注速度  $1.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ,三七皂苷  $R_1$  溶液质量浓度  $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,按照正透析法对新探针、使用 1 次和使用 2 次并分别经过处理的脑、血液探针进行体外回收率试验,每个探针在平衡 60 min 后开始收集,各 5 份样品,每份  $30 \mu\text{L}$ 。各样品经处理后进行测定,计算正向回收率,见图 4。结果显示使用 1 次和使用 2 次后并经过处理的探针与新探针相比,仍然能够保持较高的回收率,说明在探针使用后,分别用 2% 肝素钠溶液、水灌注冲洗处理后,能够维持探针半透膜的通透性能,因此在使用  $\leq 3$  次的情况下探针能够重复使用。

### 3 讨论

微透析探针回收率是微透析用于研究靶组织或器官内药物浓度的一个关键问题,影响回收率的因素有灌注速度、温度、药液质量浓度、半透膜的性质等。本实验分别研究了灌注速度、药液质量浓度、微透析探针的使用次数对脑、血液微透析探针回收率的影响,以及脑、血液微透析探针回收率的体内稳定性。脑、血液微透析探针回收率在体内 10 h 依然能够保持稳定,流速为  $1.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 时,脑、血液探针的体内回收率平均值分别为 14.0% 和 33.2%,说明微透析技术能够用于药物体内动力学的研究。

流速直接决定了半透膜两侧物质交换的效率,流速越快,单位时间内收集的样品体积越多,但是膜两侧物质的平衡时间越短,导致回收率较低;相反,流速越慢则回收率越高,但是收集的样品量也会相应减少,需要综合回收率和样品量两方面来选择流

速。本实验分别采用正透析法和反透析法考察了不同流速( $0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ )对三七皂苷  $R_1$  脑、血探针体内回收率的影响,结果发现脑、血探针体内回收率均随着流速的增加而减小,脑、血液探针体内且正、反透析法所测得的探针回收率一致,体内和体外回收率结果也一致,说明反透析法测得的回收率能够用于推测靶器官或组织内药物的质量浓度;为了兼顾回收率和样品量,本实验的后续研究选择流速  $1.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ,样品间隔时间 30 min,在此流速时,脑探针对三七皂苷  $R_1$  的体外正向回收率、体外反向回收率、体内反向回收率分别为  $(14.2 \pm 0.5)\%$ ,  $(14.5 \pm 8.1)\%$ ,  $(14.8 \pm 5.7)\%$ ,而血液探针的这 3 个数值分别为  $(33.0 \pm 2.8)\%$ ,  $(34.6 \pm 2.4)\%$ ,  $(34.2 \pm 2.4)\%$ 。

流速为  $1.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ,不同质量浓度( $50, 200, 500, 1\,000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )时,由脑、血液探针的回收率结果可知,质量浓度对探针的回收率均无影响。探针使用后的处理方法对其继续使用时的回收率有直接影响。本实验先采用高流速( $2.0 \sim 3.0 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ )灌注 2% 肝素钠溶液约 30 min,以冲洗附着在探针半透膜上的生物基质,再以低流速( $1.0 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ )灌注水约 12 h 洗去盐溶液,经上述处理后,探针能够在多次体内使用时依然保持高效率。为了得到与体内试验更加一致的结果,本实验所有体外回收率的测定均在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴中进行,所以未开展温度对探针回收率影响的研究。虽然系统地研究了影响脑、血液探针回收率的因素,但在每次开展药代动力学或者其他体内微透析收集试验时,都应该对探针的回收率进行校正,以便得到更加准确的结果。

#### [参考文献]

- [1] Hoebel B G, Hernandez L, Schwartz D H, et al. Microdialysis studies of brain norepinephrine, serotonin, and dopamine release during ingestive behavior. Theoretical and clinical implications[J]. Ann N Y Acad Sci, 1989, 575(1):171-193.
- [2] Pehek E A, Schechter M D, Yamamoto B K. Effects of cathinone and amphetamine on the neurochemistry of dopamine *in vivo* [J]. Neuropharmacology, 1990, 29(12):1171-1176.
- [3] Chaurasia C S. *In vivo* microdialysis sampling: theory and applications [J]. Biomed Chromatogr, 1999, 13(5): 317-332.
- [4] CHEN C F, Drew K L. Droplet-based microdialysis-Concept, theory, and design considerations [J]. J

- Chromatogr A, 2008, 1209(1/2):29-36.
- [ 5 ] Van S J, Maes K, Van W Y, et al. Miniaturized ultra-high performance liquid chromatography coupled to electrochemical detection: Investigation of system performance for neurochemical analysis [ J ]. J Chromatogr A, 2016, 1427:69-78.
- [ 6 ] WANG C Z, McEntee E, Wicks S, et al. Phytochemical and analytical studies of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen [ J ]. J Nat Med, 2006, 60(2):97-106.
- [ 7 ] DU Q Z, Jerzc G, Waibel R, et al. Isolation of dammarane saponins from *Panax notoginseng* by high-speed counter-current chromatography [ J ]. J Chromatogr A, 2003, 1008(2):173-180.
- [ 8 ] 夏鹏国, 张顺仓, 梁宗锁, 等. 三七化学成分的研究历程和概况 [ J ]. 中草药, 2014, 45(17):2564-2570.
- [ 9 ] 邓海英, 赖为国. 三七皂苷 R<sub>1</sub> 对急性心肌缺血大鼠模型的保护作用 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10):265-268.
- [ 10 ] ZHANG H S, WANG S Q. Notoginsenoside R<sub>1</sub> inhibits TNF- $\alpha$ -induced fibronectin production in smooth muscle cells via the ROS/ERK pathway [ J ]. Free Radic Biol Med, 2006, 40(9):1664-1674.
- [ 11 ] CHEN W X, WANG F, LIU Y Y, et al. Effect of notoginsenoside R<sub>1</sub> on hepatic microcirculation disturbance induced by gut ischemia and reperfusion [ J ]. World J Gastroenterol, 2008, 14(1):29-37.
- [ 12 ] LI C, LI Q, LIU Y Y, et al. Protective effects of notoginsenoside R<sub>1</sub> on intestinal ischemia-reperfusion injury in rats [ J ]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2014, 306(2):G111-G122.
- [ 13 ] MENG X, SUN G, YE J, et al. Notoginsenoside R<sub>1</sub>-mediated neuroprotection involves estrogen receptor-dependent crosstalk between Akt and ERK1/2 pathways: a novel mechanism of Nrf2/ARE signaling activation [ J ]. Free Radic Res, 2014, 48(4):445-460.
- [ 14 ] SUN B, XIAO J, SUN X B, et al. Notoginsenoside R<sub>1</sub> attenuates cardiac dysfunction in endotoxemic mice: An insight into oestrogen receptor activation and PI3K/Akt signalling [ J ]. Br J Pharmacol, 2013, 168(7):1758-1770.
- [ 15 ] WANG C Z, XIE J T, Fishbein A, et al. Antiproliferative effects of different plant parts of *Panax notoginseng* on SW480 human colorectal cancer cells [ J ]. Phytother Res, 2009, 23(1):6-13.
- [ 16 ] 吕耿彬, 王利胜, 陈晓丹, 等. 人参皂苷 R<sub>g</sub><sub>1</sub>、三七皂苷 R<sub>1</sub> 微透析体外回收率的研究 [ J ]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(1):59-62.
- [ 17 ] 吉恋英. 基于“MD-ABS”联用技术研究三七总皂苷及其有效组分对丹参素药代动力学特性的影响 [ D ]. 北京:北京协和医学院, 2013.
- [ 18 ] 汪晋. 三七总皂苷药动力学及药效评价新方法研究 [ D ]. 杭州:浙江大学, 2010.
- [ 19 ] 姚明江, 张鹏, 宋文婷, 等. 通络清脑注射液对脑缺血再灌注损伤大鼠脑微透析液中两种氨基酸水平的影响 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12):136-140.
- [ 20 ] 郑芳昊, 罗佳波. 微透析采样考察麻黄-桂枝药对配伍对麻黄碱药代动力学的影响 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(16):80-83.
- [ 21 ] 吴丽颖, 吕红博, 张运好, 等. 替硝唑、达克罗宁和氯己定微透析探针体外回收率及大鼠体内稳定性的研究 [ J ]. 药物分析杂志, 2014, 34(11):1942-1947.

[责任编辑 刘德文]