

· 药物代谢 ·

血液微透析技术分析阿魏酸口服给药后药代动力学过程

刘聪敏, 白洁, 杜守颖*, 陆洋*, 李鹏跃
(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的:应用血液微透析技术测定阿魏酸口服给药后药代动力学参数。方法:采用浓差法(增量法和减量法)考察探针回收率的日内稳定性及灌注速度、阿魏酸质量浓度、温度对探针回收率的影响,通过零净流量法测定阿魏酸体外回收率,并将结果与浓差法所测回收率进行比较。采用血液微透析法进行体内药代动力学研究,HPLC测定透析液中阿魏酸含量。结果:探针回收率日内稳定性良好;体外回收率与阿魏酸质量浓度无关,与灌注速度成指数型负相关;温度越高,回收率越高;利用零净流量法能准确地测定透析介质中阿魏酸含量及回收率;增量法、减量法及零净流量法测定的回收率一致。在 $2.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速下,体内平均回收率 $(28.69 \pm 1.95)\%$,口服给药后阿魏酸 9.33 min 达峰,消除半衰期 12.52 min 。结论:微透析取样技术可用于阿魏酸的药代动力学研究,减量法可作为体内微透析研究中阿魏酸回收率的测定方法。

[关键词] 阿魏酸; 微透析; 探针回收率; 药代动力学

[中图分类号] R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0176-04

[doi] 10.11653/syfy2013170176

Pharmacokinetics Analysis of Ferulic Acid after Oral Administration in Rats by Blood Microdialysis Technique

LIU Cong-min, BAI Jie, DU Shou-ying*, LU Yang*, LI Peng-yue

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

[Abstract] **Objective:** To determine pharmacokinetic parameters of ferulic acid after oral administration by blood microdialysis technique. **Method:** Days stability of probe recovery and effects of perfusion rate, the concentration of ferulic acid, temperature on probe recovery were investigated by concentration difference method (incremental and reduction method); Zero-net flux method was adopted to determine *in vitro* recovery of ferulic acid, result of this method was compared with concentration difference method. *In vivo* pharmacokinetic study was applied by blood microdialysis method, the content of ferulic acid was determined by HPLC. **Result:** Days stability of probe recovery was good; *In vitro* recovery had no correlation with the concentration of ferulic acid, but presented exponential negative correlation with perfusion rate and positive correlation with temperature; The content of ferulic acid and recovery in dialysis medium could be accurately determined by zero-net flux method. Recovery of incremental method, reduction method and zero-net flux method was the same. *In vivo* average recovery was $(28.69 \pm 1.95)\%$ with flow rate of $2.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, C_{max} of ferulic acid was reached at 9.33 min and $t_{1/2\beta}$ was 12.52 min after oral administration. **Conclusion:** Microdialysis sampling technique could be used for pharmacokinetic study of ferulic acid and reduction method could be used to determine recovery of ferulic acid in *in vivo* microdialysis study.

[Key words] ferulic acid; microdialysis; probe recovery; pharmacokinetics

[收稿日期] 20130409(016)

[基金项目] 北京中医药大学复方中药制药研究创新团队发展计划(2011-CXTD-13);北京中医药大学自主课题(2011JYBZZXS-052)

[第一作者] 刘聪敏,在读硕士,从事中药新剂型与新技术研究,Tel:010-84738615,E-mail:xingchen_lcm@163.com

[通讯作者] *杜守颖,博士,教授,博士生导师,从事中药新剂型与制剂关键技术研究,Tel:010-84738615,E-mail:dushouying@263.net;

*陆洋,博士,副教授,硕士生导师,从事中药新剂型与制剂关键技术研究,Tel:010-84738615,E-mail:landocean28@163.com

微透析技术是一种在体或离体化学采样技术,原理是血液或细胞外液中可溶性分子根据 Fick's 定律通过一种半透膜管的微小孔径,按顺浓度梯度在细胞外液与灌流液间扩散^[1]。实验时将一根探针植入目的组织中,利用特定的灌流液对微透析探针进行灌流,收集流出端的透析液。测定透析液中药物浓度,通过探针的回收率即可计算组织中药物浓度^[2]。回收率的测定常采用增量法、减量法和零净流量法。在体内试验中,由于无法获得稳态的血液中药物浓度,常用减量法代替增量法计算探针体内回收率,但前提是增量法和减量法所测回收率相等;零净流量法通常可获得较准确的回收率,但需在稳态下进行,多用于体外回收率测定以验证增量法和减量法所测回收率的准确性。

阿魏酸具有抗血小板聚集、增强前列腺素活性、缓解血管痉挛等作用,可治疗心脑血管疾病及白细胞减少等症^[3]。以往阿魏酸的体内药物分析多采用传统抽血方式^[4-5],样品前处理过程复杂,且采血后血容量减少可能会对药物分布及消除产生影响。而采用微透析法则避免了内源性物质对测定的干扰,同时减少了样品前处理过程,在同一动物体内采集大量样本,大大减少了实验动物的数量^[6]。由于微透析试验的回收率受多种因素的影响,为考察将微透析技术应用于体内测定的可行性和减量法测定阿魏酸回收率的合理性,本实验系统研究了影响阿魏酸体内外回收率的各种因素,通过微透析技术分析阿魏酸溶液口服给药后的药代动力学过程。

1 材料

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),FE20 型 pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司),BS 110S 型电子分析天平(北京赛多利斯公司),微透析系统(402 型微量注射泵,1.0,2.5 mL 玻璃注射器,130 型收集支架,CMA 公司)。

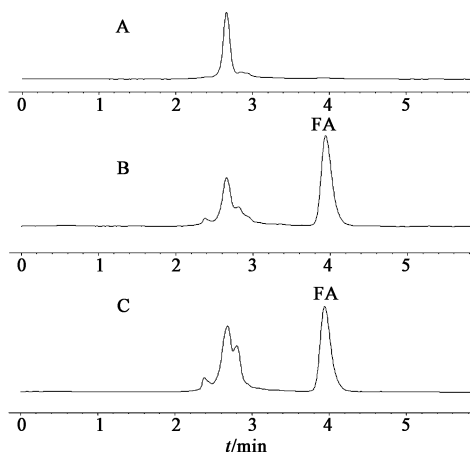
阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110826-201013),阿魏酸提取物(上海试剂一厂,纯度 98%),甲醇、乙酸为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。SD 大鼠,雄性,体重 200~220 g,由维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2012-0001。

2 方法与结果

2.1 阿魏酸含量测定

2.1.1 色谱条件 Merck RP-18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-1% 乙酸(60:40),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 323 nm,进样量 15 μL,柱

温 30 ℃,见图 1。



A. 阴性样品; B. 对照品; C. 供试品; FA. 阿魏酸

图 1 阿魏酸提取物 HPLC

2.1.2 标准曲线、精密性、稳定性考察^[7] 阿魏酸回归方程 $Y = 92.334X - 1.7245$ ($r = 0.9999$),在 PBS 缓冲液中阿魏酸线性范围 0.016 ~ 40.8 mg·L⁻¹。低、中、高 3 种质量浓度的阿魏酸对照品溶液日内精密性 RSD 分别为 2.53%, 1.31%, 0.18%, 日间精密性 RSD 分别为 2.75%, 1.43%, 0.28%, 16 h 内稳定性 RSD 分别为 1.29%, 1.90%, 1.47%, 均符合含量测定要求。

2.2 微透析血液探针体外回收率影响因素考察

2.2.1 回收率日内稳定性试验 采用增量法考察血液探针的稳定性,将血液探针的“有效透析窗”完全浸没在含有阿魏酸 576 μg·L⁻¹ 的 PBS 缓冲液中,用空白等渗 PBS 缓冲液灌注探针,流速 1.5 μL·min⁻¹,室温,每 20 min 收集 1 次透析样品(每次 30 μL),连续收集 6 h, HPLC 测定透析液中阿魏酸质量浓度,计算回收率(RG),见图 2,表明探针在测定时间内的回收率(68.58 ± 2.51)%。

$$RG = C_{\text{dialysate}} / C_{\text{perfusate}} \times 100\% \quad (1)$$

式中 $C_{\text{dialysate}}$ 为透析液中阿魏酸质量浓度, $C_{\text{perfusate}}$ 为灌注液中阿魏酸质量浓度^[8]。

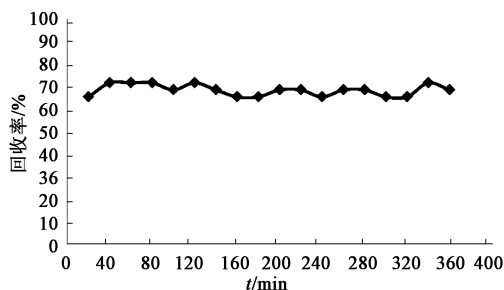


图 2 阿魏酸回收率日内稳定性试验

2.2.2 灌流速度对探针回收率的影响 将血液探

针的“有效渗析窗”完全浸没在含有 $576 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿魏酸的 PBS 缓冲液中,水温维持在 $37\text{ }^\circ\text{C}$,用空白 PBS 缓冲液分别以流速 $0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 灌注探针,各平衡 40 min ,收集 3 次微透析样品(每次 $30 \mu\text{L}$),利用 HPLC 测定渗析液中阿魏酸质量浓度,按式 1 计算回收率。将血液探针浸入不含药的空白 PBS 溶液中,用含有 $576 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿魏酸的 PBS 缓冲液分别以流速 $0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 灌注探针,同法测定渗析液中阿魏酸质量浓度,按式 2 计算减量法测定的阿魏酸回收率(RL)。

$$RL = (C_{\text{perfusate}} - C_{\text{dialysate}}) / C_{\text{perfusate}} \times 100\% \quad (2)$$

增量法和减量法测定灌流速度对回收率的影响见图 3,发现随流速的增加,回收率呈指数降低,且 2 种方法测得的回收率在各个流速下均保持高度一致。在体外试验中,为保证药物在低质量浓度时可被准确检测且样品采集时间尽可能短,最终选择灌流速度 $1.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

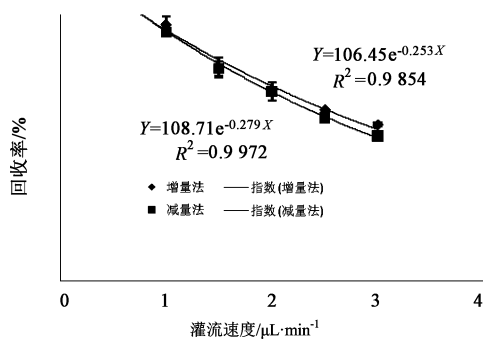


图 3 灌流速度对阿魏酸探针回收率的影响

2.2.3 质量浓度对探针回收率的影响 将血液探针的“有效渗析窗”完全浸没在含有阿魏酸质量浓度分别为 $11.52, 57.6, 576, 2880 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的等渗 PBS 缓冲液中,用空白等渗 PBS 缓冲液灌注探针,水温维持在 $37\text{ }^\circ\text{C}$,流速 $1.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,收集 3 次微透析样品(每次 $30 \mu\text{L}$),按式 1 计算阿魏酸回收率分别为 $(67.19 \pm 2.21)\%$, $(69.23 \pm 2.56)\%$, $(69.99 \pm 2.45)\%$, $(65.99 \pm 1.44)\%$ 。将血液探针的“有效渗析窗”完全浸没在空白 PBS 缓冲液中,分别用阿魏酸质量浓度 $11.52, 57.6, 576, 2880 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的等渗 PBS 缓冲液灌注探针,同法测定渗析液中阿魏酸质量浓度,按式 2 计算阿魏酸回收率分别为 $(72.73 \pm 0.64)\%$, $(69.17 \pm 3.82)\%$, $(70.22 \pm 3.41)\%$, $(70.84 \pm 2.78)\%$ 。结果表明在不同药物浓度的透析介质中,增量法和减量法测得的回收率均很接近。对透析液浓度与透析介质浓度进行线性回归,发现二者的线性关系良好,即在 $11.52 \sim 2880$

$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,阿魏酸的回收率与质量浓度无关。

2.2.4 温度对探针回收率的影响 将血液探针的“有效渗析窗”完全浸没在含有 $576 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿魏酸的 PBS 缓冲液中,水温分别设为 $25, 32, 37\text{ }^\circ\text{C}$,用 PBS 缓冲液灌注探针,流速 $1.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,每组平衡 40 min 后收集 3 次微透析样品(每次 $30 \mu\text{L}$),按式 1 计算回收率分别为 $(63.54 \pm 2.96)\%$, $(69.26 \pm 0.81)\%$, $(70.90 \pm 1.48)\%$,将血液探针的“有效渗析窗”完全浸没在不含药的空白 PBS 缓冲液中,用含有 $576 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿魏酸的 PBS 缓冲液灌注探针,同法测定渗析液中阿魏酸质量浓度,按式 2 计算回收率分别为 $(64.16 \pm 2.80)\%$, $(69.10 \pm 1.21)\%$, $(70.20 \pm 1.77)\%$ 。结果表明随温度升高探针的回收率增大。

2.3 零净通量法测定探针回收率 将血液探针的“有效渗析窗”完全浸没在含有阿魏酸 $288 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS 缓冲液中,分别用含有阿魏酸 $11.52, 57.6, 576, 2880 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS 缓冲液灌注探针,水温 $37\text{ }^\circ\text{C}$,流速 $1.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,每组先平衡 40 min ,收集 3 次微透析样品(每次 $30 \mu\text{L}$),测定,以渗析液样品与灌流液的质量浓度差对灌流液质量浓度作图,线性回归直线的斜率即为回收率,横坐标上的截距即探针外部介质中药物质量浓度^[10]。结果探针的回收率 69.82% ,透析介质中阿魏酸质量浓度 $255.46 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,与通过 HPLC 测出的透析介质中阿魏酸真实质量浓度($252.74 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的误差仅 1.06% ,说明该方法准确度高。与流速 $1.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,温度 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 时增量法和减量法测得的阿魏酸探针回收率进行统计学检验,结果三者间均无差异,故减量法可作为体内微透析阿魏酸回收率的测定方法。

2.4 血液探针体内回收率的测定

2.4.1 手术过程 取 SD 大鼠,用 20% 乌拉坦按体重($5 \mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$,腹腔注射)麻醉,颈部脱毛,剪开皮,分离出颈静脉,植入血液探针,用 1% 肝素以 $2.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速灌流 10 min 后,用 $\text{pH } 8.0$ 的等渗 PBS 缓冲液灌流 1 h ,以减少局部损伤,用含有 $800 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿魏酸的 PBS($\text{pH } 8$) 作为灌流液,灌流速度 $2.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,用 40 W 白炽灯给大鼠取暖。

2.4.2 体内回收率的稳定性 血液探针植入后,用含有阿魏酸 $800 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的等渗 PBS 缓冲液($\text{pH } 8$) 灌流,流速 $2.5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,每 20 min 收集 1 次微透析样品,共 18 次,测定透析液中阿魏酸浓度,按式 2 计算阿魏酸回收率,结果探针在测定时间内回收率 $(28.69 \pm 1.95)\%$,即微透析样品 6 h 内较稳定。

2.4.3 药动学研究 取SD大鼠5只,手术前进食12 h,自由饮水,按2.4.1项下操作植入血液探针,用空白PBS(pH 8)灌流1 h,按 $28 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给予阿魏酸PBS(pH 8)溶液,空白PBS(pH 8)作灌流液,流速 $2.5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$,给药后1 min后开始收集透析液,每8 min收集1次,共收集2 h,进行HPLC分析,按公式 $C = C_{\text{dialysis}}/R_{\text{in vivo}}$ 计算血浆中阿魏酸实际质量浓度,绘制时曲线,见图4,采用DAS 3.2.0软件进行数据处理,结果符合二室模型,参数见表1。

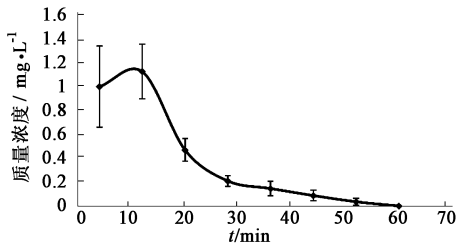


图4 阿魏酸口服给药后在大鼠体内的平均血药质量浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n=5$)

表1 阿魏酸在大鼠体内主要药动学参数($\bar{x} \pm s, n=5$)

参数	透析液
$t_{1/2\alpha}/\text{min}^{-1}$	4.61 ± 1.18
$t_{1/2\beta}/\text{min}^{-1}$	12.52 ± 2.56
$\text{AUC}_{0-1}/\text{mg} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$	24.14 ± 3.26
$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{mg} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$	26.86 ± 2.94
$T_{\text{max}}/\text{min}$	9.33 ± 3.02
$C_{\text{max}}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	1.19 ± 0.11

3 讨论

微透析取样过程中,透析液中药物含量只占血液中的一小部分,故有必要考察微透析探针针对药物的回收率,以保证血液中药物浓度可被准确测定。

回收率受探针型号、待测物质性质、灌流液性质等因素影响,本实验主要考察了药物浓度、温度及灌流速度对回收率的影响。通过体外回收率研究验证了所用血液微透析探针回收率与阿魏酸质量浓度无关,从而保证了可利用微透析技术测定血液中阿魏酸真实质量浓度。随温度的增加,体外回收率增大,为了使体外模拟环境与体内尽可能一致,将体外微透析试验的温度控制约 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。灌流速度考察表明,灌流液的流速越低则探针回收率越高,但流速降低会使样品量减少,要保证检测的灵敏性,取样间隔须相应延长,从而降低了微透析的时间分辨性。通过预试验,综合回收率、仪器检测灵敏度、取样间隔等因素,体内研究中最终选择流速 $2.5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$,采样时间间隔8 min,样品收集量 $20 \mu\text{L}$ 。

欧阳臻等^[11]曾用断尾取血方式研究阿魏酸口服给药后药动学,计算出阿魏酸在大鼠体内的 T_{max}

和 $t_{1/2\alpha}$ 分别为10.8,5.64 min,与本实验得到数据非常接近;而文献中采样10 h所得 $t_{1/2\beta}$ 和 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 分别为197 min, $68.4 \text{ mg} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$,与本实验采样1 h所得 $t_{1/2\beta}$ 和 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 有较大差异,可能是由于60 min后,透析液中药物浓度已低于定量限,导致血液中药物真实浓度不能被检测。说明微透析与取血方式研究药动学优势独特,但由于灌流液的稀释作用,当血液中阿魏酸质量浓度降至一定程度时,通过微透析技术不能准确的检出药物浓度。本课题组曾考察HPLC-MS测定灌流液中阿魏酸质量浓度,由于阿魏酸解离程度的限制,HPLC-MS定量限与HPLC相差不大,且由于灌流液中存在磷酸盐,在该色谱条件下,将磷酸盐分流会导致阿魏酸部分流失,稳定性较差。

[参考文献]

- [1] 韩慧婉,舒鸿钧,刘国诠.微透析技术及其应用[J].化学通报,2000,63(12):52.
- [2] PAN Y F, FENG J, CHENG Q Y. Intracerebral microdialysis technique and its application on brain pharmacokinetic-pharmacodynamic study [J]. Arch Pharm Res,2007,30(12):1635.
- [3] Sohn Y T, Oh J H. Characterization of physicochemical properties of ferulic acid[J]. Arch Pharm Res,2003,26(12):1002.
- [4] 冯彬彬,张建海,张继芬.川芎嗪、阿魏酸及其配伍药代动力学比较研究[J].中国中药杂志,2010,35(7):900.
- [5] 潘莹.大鼠口服川芎和通脉方后阿魏酸的药动学比较[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):193.
- [6] 张英丰,汪小根,吴阳.微透析技术进行药动学研究的发展趋势及局限性探讨[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(15):270.
- [7] 白洁,陆洋,杜守颖.线性探针微透析研究阿魏酸经皮给药后药动学[J].中国中药杂志,2013,38(5):743.
- [8] Maña S M M, Beatriz G H, Clara-Isabel C G, et al. In vitro study of experimental factors affecting the microdialysis results [J]. Anal Chim Acta, 2002, 459(1):143.
- [9] Sasongko L, Williams K M, Ramzan I, et al. Assessment of in vitro and in vivo recovery of gallamine using microdialysis [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2000, 44(3):519.
- [10] Gillian W, Craig E L. Investigation of microdialysis sampling calibration approaches for lipophilic analytes: Doxorubicin [J]. J Pharm Biomed, 2010, 53(3):490.
- [11] 欧阳臻,潘琳琳,汤建明.阿魏酸、川芎及复方脑得生中阿魏酸在大鼠体内的药动学研究[J].中国中药杂志,2010,35(2):226.

[责任编辑 全燕]