

· 学术探讨 ·

关于微透析法与血药浓度法的异同及其 药动学数据特殊处理的探索与思考

张英丰¹, 吴阳¹, 汪小根², 周莉玲^{1*}

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 广东食品药品职业学院, 广州 510520)

[摘要] 从采样方式、采样原理、适用性、发展趋势、样品浓度与机体整体浓度的关联性角度比较微透析采样技术与经典药动学采样技术的异同, 探讨微透析技术进行药动学研究的适用性, 根据采样对象性质, 深入思考其样品数据处理的特殊性, 提出并总结关于微透析样品数据的校正方法以提升微透析技术进行药动学研究的稳健性及结果可靠性。

[关键词] 微透析技术; 经典药动学采样手段; 异同; 数据处理

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0276-03

Exploration and Consideration about Differences and Similarities between Microdialysis Method and Blood Concentration Method and Pharmacokinetics Data Processing of Microdialysis Method

ZHANG Ying-feng¹, WU Yang¹, WANG Xiao-gen², ZHOU Li-ling^{1*}

(1. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

(2. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)

[Abstract] The differences between classical pharmacokinetic sampling methods and microdialysis sampling technology was compared to investigate the applicability of pharmacokinetic study and the sample data processing particularity by using microdialysis technology from the sampling model, sampling principle, applicability, development trends and the relevance between sample concentration and body concentration. The data processing specificity of microdialysis samples were deeply thought according the study object characteristics. The microdialysis samples data correction method was summarized on this basis to improve the pharmacokinetic study results robustness and reliability by using microdialysis method.

[Key words] microdialysis technique; classical pharmacokinetics sampling methods; differences and similarities; data processing

微透析技术是将类似于人工血管的探针植入到采样部位, 通过探针膜内外的浓度差使被采样物质借助浓度梯度被动扩散进探针内, 从而被灌流液连续带出, 实现活体采样的

目的。微透析技术最早应用于生物采样, 如对神经递质等内源性物质的实时监测^[1], 完成了其他采样手段难以完成或胜任的采样工作, 其本质是一种“膜采样”和“膜分离”技术, 所采集样品无需前处理可直接进样分析, 兼有“采样”与“纯化”的双重作用^[2], 大大减少样品前处理过程所带来的误差与变异, 减轻劳动强度; 每个实验动物即为一个完整样本, 获得完整的药-时曲线, 可节约实验动物, 减轻动物保护组织压力及伦理学制约。微透析技术所具有的独特优势使其在生物采样中应用越来越广泛, 采用微透析技术进行药动学的研究是其研究和应用热点^[3]。鉴于微透析技术采样原理的特

[收稿日期] 20110302(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30701097, 30672669, 30873443); 中国博士后基金项目(20070420509); 广东省自然科学基金项目(9151052005000003)

[通讯作者] *周莉玲, 教授, 博士生导师, Tel: 020-39358040

殊性,其采样模式和数据处理与经典药动学采样手段有较大不同。本文探讨了微透析采样技术和经典药动学采样的异同,并深入思考其样品数据的特殊处理方法,为研究者提供借鉴。

1 微透析采样法与经典采样手段的不同

经典药动学研究中常需要采集血液、尿液、粪便等生物样品,尤以血液最为普遍,通过测定血药浓度随时间变化来定量描述药物体内过程,称为血药浓度法。传统的血药浓度法利用均质液体样品中,某一微小体积浓度与样本来源浓度相同的原理,通过对大鼠进行眼眶采血、颈动脉插管采血,对家兔进行耳缘静脉采血等方法实时采集血液等生物样本,经前处理后即可进样分析。受动物体液总量制约,采样频率不可能无限增加,且采样时会造成体液损失,影响其正常生理状态,一般以不超过体液或血液总量 10% 为度,应在采样后适当补充体液或血液。

血药浓度法所采集样品为“实时”“瞬间”浓度,可根据给药途径、药物体内变化趋势灵活设置采样时间点及采样时间间隔,如浓度变化比较快,可加快采样频率,如药物处于消除期,则可适当减缓采样频率。

血药浓度法采样样品波动及变异较大,需要适当增加样本量。当血药浓度较高且完成采样过程基本不影响正常生理功能时,则 1 只动物即为 1 个完整的药动学样本,取少量体液完成整个采样过程,获得完整的药-时曲线,计算药动学参数的平均值即可,药动学参数变异较小;当血药浓度较低时,为满足检测限要求,需要加大采样体积,往往 1 只动物只能进行 1 个时间点采样,故在同 1 个时间点需要增加样本量,需以采样点浓度平均值计算药动学参数,药动学参数变异较大。

血药浓度法研究结果及数据质量严重依赖于样本量及采样点的选取。受国际动物保护组织压力及伦理学制约,动物实验的 3R 原则(refine, replacement, reduction, 即优化、替代、精简)也适用于药动学研究,采样点样本量不可能无限增加,故实验动物、样本量均需要严格精简,不用或少用实验动物成为药动学研究的主流方向。从动物实验部分转向计算机模拟、从发达国家向动物福利不健全的发展中国家转移成为药动学研究的新趋势。

与经典的血药浓度法采样及数据获取不同,微透析因流速较小,为满足分析仪器对最小进样体积的要求,常需要连续采集一定时间后再分析测定^[4],存在回收率与流速的矛盾,如何在最小采样间隔内获取最大样品体积且满足仪器检测限要求,是实验设计者需要慎重考虑的关键问题。微透析在采样间隔内(时间通常 > 10 min),获得的是采样开始到采样结束的累积样品,浓度为采样间隔内的“平均浓度”。由于药物体内行为瞬息万变,为保证仪器检测需要一定样品体积,而样品收集时间常常滞后于药物变化,致药动学信息部分“湮没”,不能捕捉药物浓度的瞬时变化,这是微透析技术进一步扩大应用的瓶颈。

总之,血药浓度法样品为瞬间浓度、实时浓度,动物样本量较多,需要频繁采样,劳动强度大,结果变异大,其优点是浓度变化较剧烈或者比较平缓的均适用;微透析法样品为采样间隔内的“平均样品”,反映了采样间隔内药动学行为的平均变化,药动学特征在采样间隔内被拉平,部分信息湮灭,但可实现自动化采样,劳动强度小,结果变异小,对于体内浓度变化较平缓的药动学研究比较好。

2 微透析样品数据的特殊处理

微透析样品浓度($C_{\text{dialysate}}$)并非组织脏器的真实浓度(C_{tissue}),其比值定义为相对回收率(relative recovery, RR),故微透析样品必须经过相对回收率的校正,但理论上相对回收率是无法测定。根据物质膜内、膜外转运的速度和程度仅与浓度梯度有关的原理,假设被采样物质从膜内向膜外扩散速率和膜外向膜内扩散速率一致,用含有已知浓度的灌流液灌流组织,测定灌流前后浓度差值,浓度差值对灌流前浓度比值定义为相对损失率(relative loss, RL),以可测的相对损失率代替无法测定的相对回收率进行样品校正。

$$RR = \frac{C_{\text{dialysate}}}{C_{\text{tissue}}} \quad (\text{式 } 1)^{[5-6]}$$

$$RL = \frac{C_{\text{perstate}} - C_{\text{dialysate}}}{C_{\text{perstate}}} \quad (\text{式 } 2)^{[5-6]}$$

$$C_{\text{tissue}} = \frac{C_{\text{dialysate}}}{RL} \quad (\text{式 } 3)^{[5-6]}$$

采用微透析技术进行药动学研究,需要满足 3 个前提:①体内相对损失率等于体内相对回收率;②体内相对回收率保持相对稳定,波动、变异小;③体内相对回收率与浓度无关,在较宽浓度范围内均不存在回收率的浓度依赖性。

鉴于微透析法和经典采样方法在采集方式、采样频率、样品体积及样品浓度与体液的异同方面有较大区别,在数据处理上应注意以下事项,区别对待。

无需测定样品绝对浓度的内源性物质:对于神经递质等内源性物质而言,属于机体神经-内分泌正常生理功能不可或缺的组成成分,随着机体不同生理状态或药物刺激发生变化,会不断消耗并实时补充。对此内源性物质,不需要精确测定其实时浓度、绝对浓度(因基础值的存在,既无必要也不可能测定),因其一定时间内或一定状态下,内源性物质浓度维持在一定范围,只需测定在某时间点相对基础值的变化值或相对值即可。这种情况下,如果平行测定,则样品无需进行回收率校正,可减少分析检测工作量。

需要测定绝对样品浓度的外源性物质:对于药物等外源性物质,其体内吸收、分布、代谢、排泄过程均需要精确定量,采样微透析法进行药动学研究时,需要测定其实时值、真实值或绝对值,通过药动学参数为合理给药提供借鉴。①死体积校正:微透析探针采样时,为了顺利接样,需要在出口或进口端外接接管。出口端的连接管在某个采样间隔内采样时会有一定体积的残留,在下一个采样间隔内被收集,这部分体积定义为死体积 V ($V = \text{内表面积} \times \text{长度}$),常在 2 ~ 5

μL , 而微透析样品体积多在 $10 \sim 30 \mu\text{L}$, 浓度为 2 次浓度的叠加, 故死体积占样品总体积比例不容忽视, 需将其扣减还原为真实浓度。根据作者多年实践与思考, 假设上个采样点浓度值 C_1 , 下一个采样点浓度值为 C_2 , 样品体积均为 V , 则样品真实浓度 $C_{\text{真实}}$ 可根据自拟算式(下同)进行校正:

$$C_{\text{真实}} = \frac{C_2 \times V - C_1 \times V_{\text{死体积}}}{V - V_{\text{死体积}}} \quad (\text{式 } 4)$$

采用此法校正后, 可有效解答“为何静脉注射给药第 1~2 个点微透析样品浓度明显低于后续样品浓度”的技术问题, 就在于刚开始采样时, 空白灌流液对样品的稀释。②回收率校正: 微透析探针所采集的药物并非真实浓度, 而为药物游离浓度的一部分, 其比值定义为相对回收率 RR , 故微透析样品必须进行回收率校正以获得绝对值。如为血液或组织微透析, 则血液(或组织)游离及总体药物浓度为:

$$C_{\text{血液游离}} = \frac{C_{\text{blood microdialysis}}}{RR} \quad (\text{式 } 5)$$

$$C_{\text{组织游离}} = \frac{C_{\text{tissue-microdialysis}}}{RR} \quad (\text{式 } 6)$$

$$C_{\text{total}} = \frac{C_{\text{blood microdialysis}}}{R \times \text{plasma protein bind}} \quad (\text{式 } 7)$$

$$C_{\text{total}} = \frac{C_{\text{tissue microdialysis}}}{P \times \text{tissue protein bind}} \quad (\text{式 } 8)$$

如果药物浓度为 C_0 的含药血浆或组织, 经萃取、富集后样品体积与原体积比为 x (为增加样品浓度, 富集后样品体积通常小于或等于富集前样品体积, 在忽略萃取回收率的前提下, 假设 $x < 1$), 则样品浓度为 C_0/x , 同样的血浆样品, 经血液或组织微透析采样后样品的浓度为 $RR \cdot C_0$ ($RR < 1$), 则血药浓度法样品与微透析法采集的样品浓度之比为:

$$\frac{C_0/x}{C_0 \times RR} = \frac{1}{RR \times x}$$

由上式可知, 微透析法样品的浓度药比组织或血液药物浓度低 $1/(V \cdot RR)$ 倍, 相应“灵敏度”也低 $1/(V \cdot RR)$ 倍。当血液药物浓度较高时(如采用静脉注射、灌胃给药等途径), 微透析法更有优越性; 当血药浓度很低时(如外用制剂等), 微透析样品浓度很低, 无疑会增大实验误差, 采用血药浓度法更准确些。③取样时间中点校正: 微透析样品浓度为采样间隔内的“平均浓度”, 样品经回收率校正后即动物组织中真实药物浓度, 此浓度为采样间隔时间的所有浓度的平均值, 故应对采样间隔的时间中点(middle-point time)作图, 对采集时间的起点和终点作图均是不恰当的。④取样时间内指数方程校正: 微透析样品浓度经过体内相对回收率、采样间隔的时间中点双重校正, 会引入双重误差。如果采样间隔较长, 药物体内指数衰减趋势不足以充分体现, 仅仅采用“时间中点浓度校正”是远远不够的, 必须要采用相应方法校正。假设在采样周期为 Δt (常 $\geq 10 \text{ min}$), 药物在此周期内呈指数衰减, 药物在血液或组织的消除速率常数为 k , 采样周期内达到微透析样品浓度的时间点为 T , 则采样结束时微透析样品

浓度可采用下式校正, 计算在采样周期终点的样品浓度:

$$T = \frac{[\ln(k\Delta t) - \ln(1 - e^{-k\Delta t})]}{k} \quad (\text{式 } 9)$$

(Δt 为采样间隔, k 为消除速率常数, T 指采样间隔中达到微透析样品浓度的时间点)

$$C_i = C_0 e^{-k(\Delta t - T)} \quad (\text{式 } 10)$$

(C_0 为微透析样品浓度, 即采样间隔的平均浓度, C_i 为采样间隔终点)

综上所述, 微透析技术是一种“间接”的药动学研究手段, 与“直接”的血药浓度法在样品内涵、样品与体液浓度的关联上及样品数据的处理上均存在较大差异。微透析技术的优势非常突出, 但缺点也很明显, 有严格的适用范围及应用前提, 不能盲目使用。在满足前提条件下, 微透析技术是非常优越的新型药动学研究手段。

[参考文献]

- [1] Rainer Spanagel, Bernd Eilbacher, Rolf Wilke. Memantine-induced dopamine release in the prefrontal cortex and striatum of the rat—a pharmacokinetic microdialysis study [J]. Eur J Pharmacol, 1994, 262 (1): 21.
- [2] Horst Beier, Katharina Kaiser, Manfred Langhans, et al. Peritoneal microdialysis in freely moving rodents: An alternative to blood sampling for pharmacokinetic studies in the rat and the mouse [J]. Eur J Pharmac Sci, 2007, 30 (1): 75.
- [3] Roger K Verbeeck. Blood microdialysis in pharmacokinetic and drug metabolism studies [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2000, 45 (3): 217.
- [4] Fu Jun, Feng Xuemei, Yuan Haihong, et al. Study of ocular pharmacokinetics of in situ gel system for $S(-)$ -satorpane evaluated by microdialysis [J]. J Pharmac Biomed Anal, 2008, 48 (3): 840.
- [5] Manuela de L T Vieira, Rajandra P Singh, Hartmut Derendorf. Simultaneous HPLC analysis of triamcinolone acetonide and budesonide in microdialysate and rat plasma: Application to a pharmacokinetic study [J]. J Chromatography B, 2010, 878 (29): 2967.
- [6] Jasper Stevens, Dirk-Jan van den Berg, Sanne de Ridder, et al. Online solid phase extraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometry to analyze remoxipride in small plasma, brain homogenate, and brain microdialysate samples [J]. J Chromatography B, 2010 (14): 969.

[责任编辑 邹晓翠]