

微透析技术-同位素示踪法联用进行青藤碱贴剂的皮肤局部药代动力学研究

张英丰, 于洋, 周莉玲*
(广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] 目的: 进行青藤碱贴剂的皮肤局部药代动力学研究。方法: 微透析技术与同位素示踪法联用, 以 HPLC-UV 和液闪计数仪为检测工具, 以微透析探针为采样手段, 将线性微透析探针植入大鼠皮下组织, 采用释放量法测定青藤碱皮肤相对损失率, 实时、活体、动态监测青藤碱皮下组织浓度。皮肤微透析样品浓度经相对损失率校正后进行房室和非房室模型拟合。结果: 房室模型拟合不佳。非房室模型参数显示皮肤药物浓度达峰时间约 6.3 h, 平均滞留时间 MRT 约 18 h。结论: 微透析法较好的采集了青藤碱贴剂经皮给药的皮肤局部药代动力学特征, 是局部药代动力学良好的研究手段。

[关键词] 青藤碱贴剂; 微透析技术; 同位素示踪法; 皮肤局部药代动力学

[中图分类号] R 285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0147-05

Local Pharmacokinetics Study of Sinomenine Patch by Using Microdialysis Technology Combined with Isotope Tracer Method

ZHANG Ying-feng, YU Yang, ZHOU Li-ling*
(Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the skin local pharmacokinetics of Sinomenine Patch. **Method:** The microdialysis technology was used as sampling tool combined with isotope tracer method. The HPLC-UV detector and liquid scintillation counter was selected as detection tool. The relative loss (RL) was determined by using delivery method. The liner probes were implanted into the subcutaneous tissue to determine the real-time, in vivo concentration of sinomenine. The skin microdialysis sample was calibrated by relative loss and fitted with compartment and non-compartment model. **Result:** The compartment model was not the good model. The non-compartment parameters showed that the maximum skin concentration appeared at about 6 h after drug administration and the mean residence time (MRT) was about 18 h. **Conclusion:** The microdialysis technology could collect the local skin pharmacokinetics characteristics of transdermal administration and of sinomenine was the appropriate study tool.

[Key words] Sinomenine Patch; microdialysis technology; isotope tracer method; skin local pharmacokinetics

[收稿日期] 20100207(003)

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30672669); 中国博士后基金资助项目(20070420509)

[第一作者] 张英丰, 讲师, 出站博士后, 研究方向为生物药剂学与药代动力学, Tel: (020) 39358043; E-mail: zyfeng-2006@163.com

[通讯作者] * 周莉玲, 教授, 博士生导师, 从事新剂型新技术与药代动力学研究, Tel: (020) 39358040, E-mail: zhouliling717@sina.com

血液在药物的吸收及体内分布起着桥梁作用, 靶组织药物浓度、药效通常与血药浓度具有较好的相关性, 故药代动力学研究目前多基于血药浓度法, 通过测定血药浓度来间接评价药物的体内行为, 对于以整体作用为主的药物或制剂而言是较好的方法。但对于经皮、靶向给药、结肠定位释药等新型给药系统而言, 通常以局部作用为主或药物富集于局部组织, 则靶组织药物浓度和血药浓度相关性较差, 只测定

血药浓度明显不足于反映出药物的体内过程。故对新型给药系统而言,基于血药浓度的血药浓度法研究只是可行而不是最佳研究方法。

微透析技术通过将具有“半透膜”的微透析探针植入到靶部位,“实时、动态、微创”地监测靶组织药物浓度^[1-2],具有“血药浓度法”无可比拟的优越性,故基于微透析技术的药动学研究是新型给药系统的理想研究手段,应用越来越广泛。靶组织药物浓度通常较低,需要高通量、灵敏、快速的检测方法。同位素示踪法以其简便、灵敏的特点在药动学研究中也到了广泛应用。

该文拟以具有抗炎、镇痛等活性的青藤碱为研究对象,制备含有³H-青藤碱的贴剂,采用线性微透析探针为采样手段,以液闪计数仪为检测手段,检测经皮给药后青藤碱在皮肤皮下组织的药物浓度,研究其在皮肤深层的局部药动学,为以经皮给药为代表的局部药动学研究提供借鉴。

1 材料

1.1 药品与试剂 青藤碱:中国药品生物制品检定所(批号 0774-200105);³H-青藤碱:北京原子高科股份有限公司采用同位素气液催化交换法标记完成(浓度 1.0 mCi/mL,放射性活度 2.0 mCi,放射性比活度 2 mCi/mg,放射化学纯度 > 95%,溶解于无水乙醇中);闪烁剂:PPO(E. Merk 公司)、POPOP(KOGrLight 公司);NaCl, CaCl₂, KCl, 乙二胺均为分析纯。

1.2 动物 健康 SD 大鼠,雄性,清洁级,体重(300 ± 20)g(广州中医药大学动物实验中心提供,许可证号 SCXK 粤 2003-001)。

1.3 仪器 PE1450 液闪计数器(芬兰 PE 公司);戴安 SummitP680 型高效液相色谱仪,包括 p680 泵、UVD170U 可变波长紫外检测器、Chromceon 色谱工作站。

2 方法

2.1 HPLC 检测青藤碱分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱:大连依利特 Hypersil BDS C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相甲醇-水(1:1),加入的 0.2% 乙二胺作为改性剂,流速为 1 mL · min⁻¹,检测波长为 265 nm,柱温为室温。

2.1.2 线性关系考察 精密称取 P₂O₅ 干燥 24 h 至恒重的青藤碱标准品 7.50 mg,置于 25 mL 量瓶中,甲醇定容,振摇即得浓度为 0.30 mg · mL⁻¹ 的标准

品贮备液。分别吸取 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL 注入高效液相色谱仪,记录峰面积。

2.1.3 精密度的实验 青藤碱标准品在 1 d 内连续进样 5 次,每次进样 10 μL,并分别在连续 5 d 内每天进样 1 次,每次进样 10 μL,考察日内精密度和日间精密度的。

2.1.4 稳定性实验 将用于测定相对损失率的皮肤微透析样品在 0, 2, 4, 6, 8, 16 h 分别进样 5 μL,记录峰面积。

2.1.5 阴性干扰实验 分别称取 8.599 g NaCl, 0.144 g CaCl₂, 0.298 g KCl 溶解于蒸馏水中,并定容至 1 000 mL,用 0.45 μm 的水系微孔滤膜过滤即得林格氏液(Ringer's 液)。分别吸取 10 μL 的空白林格氏液、标准品液、标准品 + 林格氏液、微透析样品注入高效液相色谱仪中,对比色谱图,观察在青藤碱出峰位置是否存在干扰。

2.1.6 检测限与定量限 分别配制不同浓度的标准品溶液,分别进样 10 μL,按 S/N = 3 计算检测限,按 S/N = 10 计算定量限。

2.2 微透析-放射性同位素示踪法进行含³H-青藤碱的青藤碱贴剂局部药动学研究

2.2.1 含放射性³H-青藤碱的青藤碱贴剂制备 精密量取放射量为 0.5 mCi 的³H-青藤碱无水乙醇液 0.5 mL(相当于 18.5 MBq),与定量的青藤碱混和后按已有的青藤碱贴剂制备方法制备含有³H-青藤碱的贴剂。

2.2.2 在体空白灌流液本底的测定 SD 大鼠戊巴比妥钠 ip 麻醉(50 mg · kg⁻¹)后,彩超监控下腹部皮下植入线性微透析探针,以 2 μL · min⁻¹ 的灌流速度灌流空白林格氏液,连续收集 100 μL,取样 25 μL,加入水性闪烁剂 1 mL,进行 5 min 内衰减计数(dpm)作为液闪计数仪的本底。

2.2.3 皮肤微透析探针相对损失率(Relative Loss, RL)的测定^[3] SD 大鼠麻醉后腹部皮下组织植入线性微透析探针,灌流空白林格氏液平衡 1 h 后,以 1.5 μL · min⁻¹ 的流速灌流浓度为 0.162 mg · mL⁻¹ 的青藤碱林格氏液(C_{perfusate}, mg · mL⁻¹),20 min 为采样间隔,每份样品 30 μL,共收集 3 份,HPLC 测定透析液浓度(C_{dialysate}, mg · mL⁻¹)。按照(式 1)测定青藤碱的相对损失率 RL。

$$RL = \frac{C_{\text{perfusate}} - C_{\text{dialysate}}}{C_{\text{perfusate}}} \quad (\text{式 1})$$

2.2.4 在体大鼠皮肤微透析实验 在测定大鼠在体皮肤相对损失率 2 h 后,将计算面积的青藤碱贴剂贴敷于大鼠腹部,以相同的流速灌注空白林格氏液、以相同的采样间隔采样,每份样品 30 μL ,连续 20 h,精密吸取 25 μL 微透析样品,准确加入 1 mL 水性闪烁液,每份样品测定 5 min,采用液闪计数器测定放射性强度 ($C_{\text{dialysate}}$, dpm),数值扣除本底并经

相对损失率 RL 校正^[4],即得到青藤碱皮下真实浓度 (C , dpm),实验重复 4 次。

按照(式 2)计算³H-青藤碱在大鼠皮下组织的真实浓度(以放射性强度 dpm 值表示)。皮肤微透析的示意图见图 1。

$$C = \frac{C_{\text{dialysate}}}{RL} \quad (\text{式 2})$$

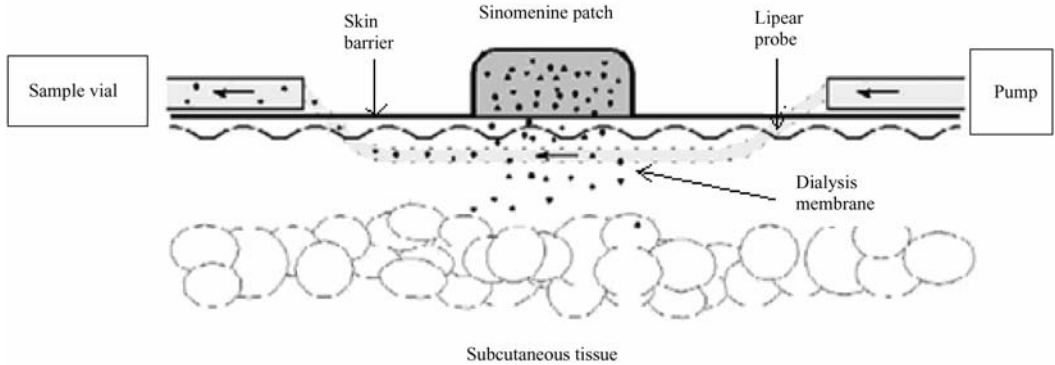


图 1 青藤碱贴剂皮肤微透析示意

2.3 数据处理 以皮肤微透析样品浓度(以放射性强度表示, $C_{\text{dialysate}}$, dpm)对采样间隔的时间中点作图^[5],采用 Kinetica 4.4 软件拟合,根据实测值与理论值的相关性、曲线拟合优度、AIC、SIC 等指标,确定最佳房室模型,同时计算非房室模型参数。

3 结果

3.1 标准曲线与线性范围 以峰面积 (A)对进样量 (X , μg)进行线性回归,得回归方程 $A = 13.528X - 0.368$ ($r = 0.9999$),进样量在 0.15 ~ 3.00 μg 呈良好的线性关系。HPLC 检测限约为 1.5 ng,定量限约为 4 ng。

3.2 青藤碱的 HPLC 色谱行为及专属性 在上述色谱条件下,青藤碱出峰位置无吸收峰出现,杂质峰与青藤碱得到良好分离,分离度佳,具有良好的专属性,分析方法可行。结果见图 2。

3.3 精密度、稳定性试验 结果表明青藤碱对照品溶液的峰面积日内、日间 RSD 分别为 1.01%, 1.03%,精密度较好;在微透析样品放置的 16 h 内,峰面积 RSD 0.57%,在实验时间内保持相对稳定。

3.4 药动学参数 结果表明青藤碱皮下药动学符合一级速率、一室开放模型,但整体上相关系数拟合优度均不佳,故放弃房室模型拟合。采用非房室分析法-血管外给药途径模块计算统计矩参数。半对数放射强度 (dpm)-时间 (h) 曲线拟合图见图 3,统计矩参数见表 1。

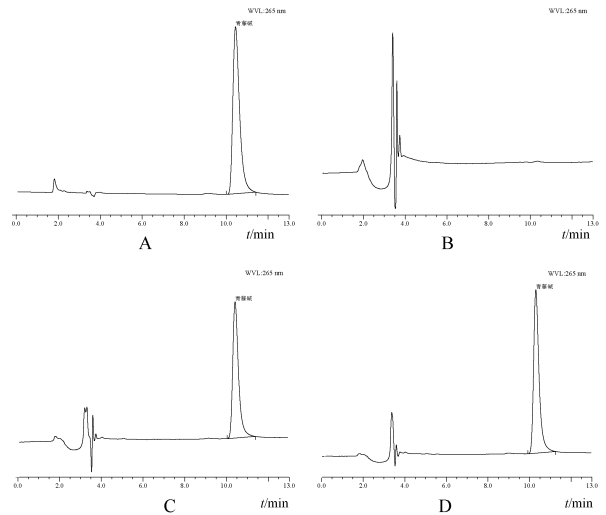


图 2 青藤碱 HPLC 图

A. 对照品;B. 空白灌注液;C. 空白灌注液 + 对照品;D. 测定相对损失率微透析样品

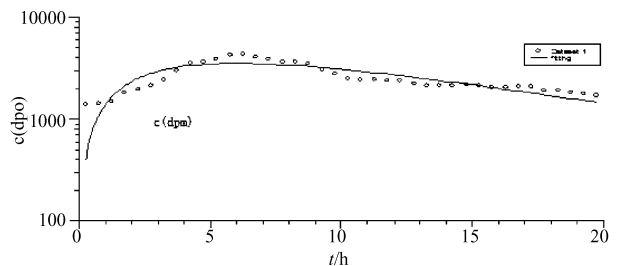


图 3 青藤碱皮肤微透析皮下组织样品平均半对数放射强度-时间曲线拟合

表 1 青藤碱贴剂统计矩模型药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

参数	数值	参数	数值
AUC _{last} [h(dpm)]	50 558	T _{half} (h)	10.3
AUC _{extra} [h(dpm)]	25 379.4	MRT(h)	17.8
AUC _{tot} [h(dpm)]	75 937.8	AUC _{all(CPred)} [h(dpm)]	50 558.5
% AUC _{extra}	33.4	AUC _{all(CObs)} [h(dpm)]	50 558.5
AUMC _{last} [h ² * (dpm)]	473 228	MRT _{last} (h)	9.4
AUMC _{extra} [h ² * (dpm)]	879 686	C _{max} (dpm)	4355
AUMC _{tot} [h ² * (dpm)]	1.35291e + 006	T _{max} (h)	6.3

4 结论

从房室模型拟合看出,拟合曲线偏离实验数据较大,拟合不佳。经皮给药系统因其“绝对吸收量少、绝对生物利用度低”,故其药动学具有极大的特殊性,不宜采用房室模型来处理。通过统计矩分析,结果表明皮肤药物达峰时间约 6.3 h,平均滞留时间 MRT 约 18 h,半衰期 T_{1/2} 约 10 h,说明药物在皮肤中以较短的时间达到峰值,并维持相当长时间,且药物浓度波动不大,保持相对平稳,表明青藤碱制备成贴剂后可长时间、平稳的渗入并滞留于局部组织中,更有效的治疗疾病。

5 讨论

同位素示踪法具有灵敏度高、检测方便、样品预处理简单这些优点,使其成为研究生物制品、痕量样品体内过程的理想测定方法,在药代动力学研究中广泛应用。常规同位素示踪法所检测的只是原形药物和(或)体内代谢产物总的放射性强度,不能区分原形药物还是代谢产物,且数据精密度不及 HPLC, GC 等仪器。如果要研究体内转化过程等复杂环节,必须进行定位标记或双标记,且必须结合 HPLC, SDS-PAGE 等分析方法。同位素测定值有一定的波动性,符合统计规律,但在较长测定时间内,放射性计数值保持相对稳定,故适当增加测定时间会增加实验结果的可信度。放射性同位素有¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁴C, ³H 等。³H 释放的射线为软的低能 β 射线,不能直接检测,必须用液闪计数器检测,这也限制了它的进一步应用。

³H 的放射性半衰期高达 12.3 年,容易发生放射性污染。如果在灌注器中灌注³H-青藤碱林格氏液测定相对损失率时必将污染灌注装置及 HPLC,为避免³H-青藤碱的放射性污染,在相对损失率测定时采用无放射性的青藤碱代替。从化学结构看,³H-青藤碱与青藤碱的差别只在于³H 原子代替了 H 原子,化学结构和分子量差异极小,其相对损失率值理论

上是一致的,故本实验中采用³H-青藤碱来代替青藤碱有其合理性。

根据文献,亦可以直接采用放射性强度来计算放射性药物的相对损失率^[6-7](RL)和相对回收率(Relative recovery, RR),见式 3~4:

$$RR = \frac{dpm_{dialysate}}{dpm_{medium}} \quad (式 3)$$

$$RL = \frac{dpm_{perfusate} - dpm_{dialysate}}{dpm_{perfusate}} \quad (式 4)$$

液闪计数器必须检测本底(相当于液相的噪声),在样品测定后需扣除本底。部分文献直接以每分钟衰减计数(dpm)进行药动学数据处理。因单位质量(mg)放射性药物的放射性强度之比定义为放射性比活度(单位:mCi/mg, 1 Ci = 37 mBq),放射性强度与物质的量存在定量关系,故可换算为药物质量(通常为 pg 级)。为方便药动学参数的计算本文直接采用 dpm 进行药动学参数的求算。

统计矩模型属于概率统计范畴,系以矩(moment)来表示随机变量的某种分布特征。机体可认为是一个系统,药物在体内残留的时间分布决定着体内药物浓度的时程,药物体内过程便是这些随机变量的总和,药时曲线就可以视为某种概率统计曲线,可用药物分子滞留时间的频率或概率加以描述,进而用统计矩分析。统计矩分析克服了房室分析所不可避免的随意性的缺点,不依赖于模型,且计算简单。

近年来出现了对房室模型分析药动学数据的反思,主张峰浓度及达峰时间直接从数据中读出,AUC 采用梯形法计算,除了静脉注射给药外,其他给药途径的药动学参数并不主张采用房室模型分析,代之以统计矩法。

微透析样品浓度并非真实浓度,其比值被定义为相对回收率(RR),需要 RR 进行校正。前期实验证实相同流速下,相对损失率与相对回收率值是一致的,而体内无法直接测定 RR,故可以以 RL 来代替 RR 进行微透析样品的校正。相对损失率 RL 是微透析样品测定值与实际值的桥梁,其质量优劣会极大影响实验结果。本实验采用释放量法进行相对损失率的测定,相对损失率可能存在波动情况,故释放量法并非最完美的相对损失率测定方法,可采用如下方法进行改进:①制备青藤碱放射性同位素³H-青藤碱,微透析样品采用 HPLC-液闪计数器检测器检测,相对损失率采用普通紫外检测器检测青藤碱浓度;

②备青藤碱的稳定性同位素,根据其分子离子峰的细微差异作为分离依据,以其稳定性同位素做为内标物,采用 LC-MS 检测以提高相对损失率的精确度和稳定性。

[参考文献]

[1] Yun-Ju Chen, Lie-Chwen Lin, Ming-Hwang Shyr, *et al.* Pharmacokinetics of protein-unbound linezolid in the blood and the mechanism of hepatobiliary excretion in the rat [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 570:59.

[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 Pharma Sci*, 2007, 30(1):75.

[3] Elisabet Børsheim, Per-Anders Jansson. Experiences of the ¹⁴C-ethanol technique for blood flow measurements in human subcutaneous adipose tissue [J]. *Life Sci*,

1998, 62(11):967.

[4] L. Zimmer, E. Kodas, D. Guilloteau, *et al.* Microdialysis as a tool for in vivo study of dopamine transporter function in rat brains [J]. *J Neurosci Methods*, 2000, 103(2):137.

[5] Magnus Rizell, Peter Naredi, Per Lindnér, *et al.* Histamine pharmacokinetics in tumor and host tissues after bolus-dose administration in the rat [J]. *Life Sci*, 2002, 70(8):969.

[6] Kay D Rittenhouse, Robert L Peiffer Jr, Gary M Pollack. Evaluation of microdialysis sampling of aqueous humor for in vivo models of ocular absorption and disposition [J]. *J Pharm Biomed Analysis*, 1998, 16(6):951.

[7] Magnus Rizell, Peter Naredi, Per Lindnér, *et al.* Validation of the internal reference technique for microdialysis measurements of interstitial histamine in the rat [J]. *Life Sci*, 1999, 65(17):1765.

[责任编辑 邹晓翠]

(上接第 146 页)

表 7 山豆根 B 不同剂量对小鼠肝脏损伤病理 Radit 分析结果

组别 g/kg	病变程度					合计	P
	-	+	++	+++	####		
空白	3	2	4	2	0	11	
12.4	0	3	3	0	0	6	>0.05
10.8	0	1	5	8	0	14	>0.05
10	0	3	6	4	1	14	<0.05
9.2	0	6	4	4	0	14	<0.05
8	0	4	7	1	0	12	<0.05
7.2	0	3	6	5	0	14	<0.05

4 讨论

山豆根为临床常用药,临床不良反应报道中以胃肠道反应为主,但神经毒性反应引起的损害最严重,两者经常伴行。为了临床更加安全应用山豆根,对其毒性进行研究,了解其毒性特点是非常必要的。山豆根急性毒性时量效关系病理形态学研究显示:给药后肝细胞肿大,肝脏指数均显著升高,病理检查均显示肝细胞不同程度的损伤,主要表现为肝细胞肿大,变性坏死,炎症细胞的浸润。本实验结果显示山豆根单次大剂量给药可加重肝脏负荷,造成肝脏病理损伤,并呈现一定的时量效关系,临床运用山豆根时应把握好剂量,防止剂量过大造成肝损伤。

另外,本实验中的山豆根虽同为四川产地,提取

方法与保存方法一样,但药材供应商不同,批号也不同,毒性剂量显示有较大的差异,可能为药材种植环境不同,导致毒性成分含量有一定差别,毒性特征不一样,有可能其疗效也存在一定的差异。因此应进一步加强对其质量控制研究,保证临床更加安全有效的应用山豆根。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会·中国药典[S].一部.北京:化学工业出版社,2005:19.

[2] 葛红强. 山豆根临床应用与研究[J]. *时珍国医国药*, 2000, 11(11):1036.

[3] 武忠秀. 儿童服用山豆根中毒 1 例报道[J]. *中国民间疗法*, 2004, 12(10):58.

[4] 林雪. 服过量山豆根煎剂致严重不良反应 1 例[J]. *中国中药杂志*, 2002, 27(7):559.

[5] 王兴远, 张维明. 群体性急性山豆根中毒的救治体会(附 56 例报告)[J]. *华西医学*, 2009, 24(8):2036.

[6] 公素琴, 朱孟国. 山豆根毒副反应综述[J]. *云南中医中药杂志*, 2004, 25(2):48.

[7] 连梅耘. 中药山豆根的不良不良反应[J]. *海峡药学*, 2008, 20(8):173.

[8] 何桂霞, 李玲, 肖锦仁, 等. 藤茶总黄酮对四氯化碳致急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. *湖南中医学院学报*, 2004, 24(4):7.

[责任编辑 邹晓翠]