

微透析法进行盐酸青藤碱肌注给药的药代动力学研究

张英丰, 王利胜, 周莉玲*
(广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] 目的: 微透析法进行盐酸青藤碱肌注给药的药代动力学研究。方法: 微透析探针植入大鼠的右心室, 实时、活体采集肌注盐酸青藤碱后的透析液样品, HPLC 检测样品浓度, 微透析样品浓度经校正后进行房室和非房室模型拟合。结果: 盐酸青藤碱肌注后 C_{max} 为 $3.127 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, T_{max} 为 101 min, MRT 为 191 min, 结果表盐酸青藤碱肌注后血药浓度呈一级速率、一室模型。结论: 微透析法能较好的反映盐酸青藤碱肌注给药的药代动力学特征, 微透析采样手段可作为药代动力学的理想手段。

[关键词] 盐酸青藤碱; 肌肉注射; 微透析技术; 药代动力学

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-0109-04

Pharmacokinetics Study on Sinomenine Hydrochloride in Rats with Administration route of Intramuscular Injection by Using Microdialysis Method

ZHANG Ying-feng, WANG Li-sheng, ZHOU Li-ling*

(Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] Objective: To explore the pharmacokinetics of sinomenine hydrochloride by using microdialysis method. **Method:** The microdialysis probe was introduced to right ventricle of rats as sampling tools for real-time and *in vivo* collecting samples after intramuscular injection. The dialysate samples were determined by HPLC. After the dialysate concentration was calibrated, the blood-drug concentration was fitted with compartment and noncompartment model. **Result:** The results shows that physiological disposition of Sinomenine Hydrochloride was fitted to first order rate and open one-compartment model. The main pharmacokinetics parameters were as following: C_{max} $3.127 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, T_{max} 101 min, MRT 191 min. **Conclusion:** The pharmacokinetics characteristics of Sinomenine Hydrochloride was collected by using microdialysis method which could be selected as study tool.

[Key words] sinomenine hydrochloride; intramuscular injection; microdialysis technology; pharmacokinetics

盐酸青藤碱是具有抗炎、镇痛作用的水溶性生

物碱, 临床上已有应用。肌肉注射是临床常用的给药途径, 其药代动力学研究相对口服和静脉注射给药途径薄弱些^[1-2]。

[收稿日期] 20100111(015)

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30672669, 30873443); 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, 从事新剂型技术与药代动力学研究, Tel: (020) 39358040, E-mail: zhouliling717@sina.com

微透析技术是近年来兴起的新型药代采样技术, 具有“实时、在线、活体、动态”采样的优势, 在药代动力学研究、药物体内分布、代谢产物研究、蛋白结合率等领域中有广泛应用。但少见以微透析技术进行肌肉注射给药的药代动力学研究。

本实验以微透析技术为采样手段, 探讨盐酸青藤碱肌注给药的药代动力学特征, 供临床参考。

1 材料

1.1 药品与试剂 盐酸青藤碱(由盐酸青藤碱原料药精制而来,经峰面积归一化法测定,其纯度 98%,符合对照品的要求);甲醇(天津科密欧化学试剂开发中心,色谱纯);肝素钠注射液(国药准字 H32020612,江苏万邦生化医药股份有限公司);水为超纯水,乙二胺、氯化钠、氯化钾等为分析纯。

1.2 动物 健康雄性 SD 大鼠,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 戴安 SummitP680 型高效液相色谱仪(p680 泵和 UVD170 可变波长紫外检测器,Chromececo 色谱工作站;1/10 万电子分析天平,Sartorius 公司)。美国 BAS 公司微透析设备(灌注器推进泵 MD1001),灌注器(1 mL, MD-0100),灌注器支架(MD1002),流速控制器(MD1000)。CMA/20 同心环形微透析探针(外径 360 μm,活性透析膜长度为 4 mm,相对分子质量截留值为 20 kD,瑞典 CMA 公司)。

1.4 软件 药代动力学软件 Kinetica 4.4(美国热电公司)。

2 方法

2.1 方法学考察

2.1.1 色谱条件 色谱柱大连依利特 Hypersil BDS 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相甲醇-水(50:50),加入 0.25% 的乙二胺作为改性剂调节 pH;流速 1 mL · min⁻¹;检测波长 265 nm;柱温室温。

2.1.2 标准曲线的制备 精密称取 P₂O₅ 干燥器中干燥至恒重的盐酸青藤碱标准品 7.06 mg,置于 10 mL 量瓶中,流动相定容,振摇即得浓度为 0.706 g · L⁻¹ 的对照品贮备液。分别对对照品储备液进行倍比稀释得浓度分别为 0.353, 0.176, 0.088, 0.044, 0.022, 0.011 g · L⁻¹ 对照品液,均进样 10 μL。

2.1.3 精密度考察 取 0.706, 0.088, 0.011 g · L⁻¹ 的对照品液分别在 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。

2.1.4 稳定性试验 配制浓度为 50.6 μg · mL⁻¹ 盐酸青藤碱水溶液分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12 h 进样 1 次,测定峰面积值。

2.1.5 专属性考察 取 SD 大鼠,4% 戊巴比妥钠腹

腔注射麻醉(50 mg · kg⁻¹),仰位固定于鼠板,手术器械钝性分离颈静脉,在引导管的保护下、在保持 1 μL · min⁻¹ 的灌流速度保持探针膜处于湿润状态的前提下将探针朝向右心室方向植入,探针的半透膜最终处于右心室内,平衡 1 h 后以相同流速灌流空白林格氏液,连续收集 100 μL,分别进样标准品、空白透析液、空白透析液与标准品的混合物,对比色谱图。

2.2 探针的前处理 将探针浸泡于 50% 的乙醇-水中 2 h,以除去探针活性膜表面的甘油等阻碍分子扩散的物质,随即用林格氏液以 0.5 μL · min⁻¹ 的灌流速度灌流过夜。在体内实验前将探针活性膜置于肝素钠注射液中以 0.5 μL · min⁻¹ 的灌流速度灌流空白林格氏液 2 h,使探针膜内外充分饱和肝素钠注射液,防止在实验过程中凝血。

2.3 体内相对损失率(Relative Loss, RL)的测定 方法见 2.1.5 项下,将探针植入大鼠右心室,平衡 1 h。探针以 1 μL · min⁻¹ 的流速灌流浓度为 50.6 mg · L⁻¹ 的盐酸青藤碱液,20 min 为采样间隔,连续采集 5 份样品。

2.4 给药时间的选择 因测定相对损失率所灌流的盐酸青藤碱会扩散到探针膜外进入血液里,如果在测定结束就立即给药,则会产叠加,需要在其代谢至一定程度后再给药,故给药时间的选择也是非常重要的。在相对损失率测定结束后的 0.5, 1, 1.5, 2, 3 h 5 个时间点,对 2.3 项下的实验大鼠继续用微透析探针采集血浆样品,进样分析,结果表明在 2 h 左右检测不到盐酸青藤碱,故给药时间选择在测定相对损失率后的第 3 h。

2.5 微透析法进行盐酸青藤碱大鼠肌注给药的药代动力学研究^[3] 测定相对回收率后,以 1.5 μL · min⁻¹ 的灌流速度灌流空白林格氏液继续灌流 1 h,然后大鼠单侧股部肌肉注射盐酸青藤碱生理盐水溶液(用前以无菌滤器除菌)0.4 mL(相当于 10 mg · kg⁻¹),同时开始采样,20 min 为取样间隔,每份样品 20 μL,连续取样 7 h,及时、直接进样分析测定透析液药物浓度,并经相对损失率校正为血液中真实的盐酸青藤碱浓度。实验重复 3 次,每只大鼠均经过自身体内相对损失率的校正。

2.6 探针的后处理 将探针浸渍于活性约为 1 000 U · mL⁻¹ 的肝素钠溶液约 5 min,若探针表面仍有白色附着物,用擦拭纸的边缘小心挑下附着物,将探针

浸渍于超纯水中,以 $2 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速灌流超纯水 mL,充分洗脱掉活性膜表面吸附的杂质更换干净的水,将探针浸渍于水中,直至下次使用(期间应定期换水)。

2.7 数据处理与模型拟合^[3] 微透析探针所采集的透析液浓度并非真实值,仅为真实血浆浓度的一部分,其比值即为相对损失率,故相对损失率是微透析样品浓度与真实浓度的桥梁,必须在采样前对其测定。

灌流液浓度 ($C_{\text{perfusate}}$) 与透析液浓度 ($C_{\text{dialysate}}$) 之差与透析液浓度比值即为相对损失率,体内真实血药浓度必需经相对损失率校正。

按(式 1)计算体内相对损失率。

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

透析液浓度经相对损失率校正为血液中真实的盐酸青藤碱浓度,见(式 2)。

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

3 结果

3.1 盐酸青藤碱的 HPLC 色谱行为及专属性 结果表明,在上述色谱条件下,空白血浆中盐酸青藤碱出峰位置无吸收峰出现,血浆杂质峰与盐酸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。见图 1。

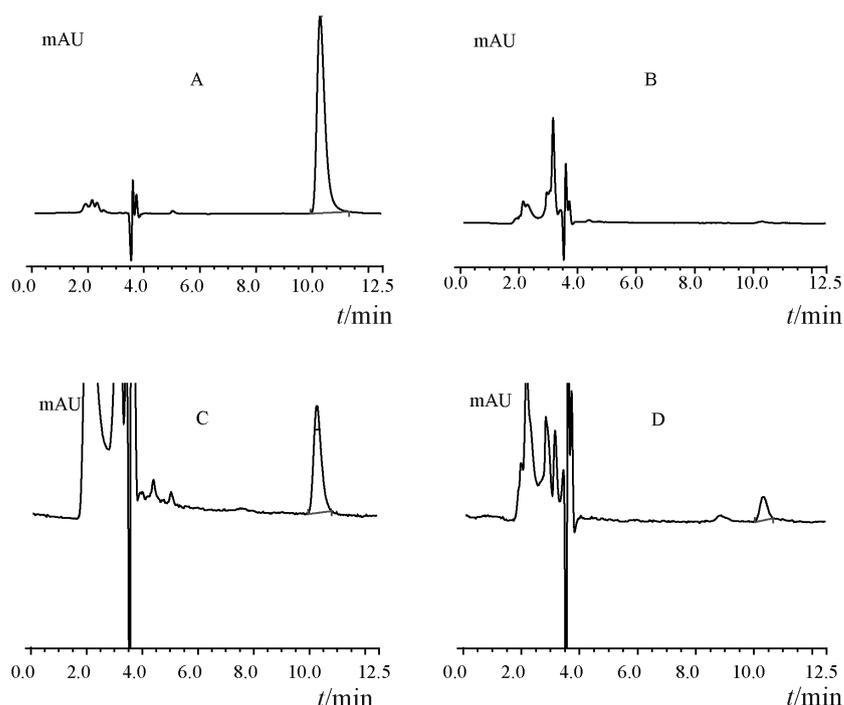


图 1 盐酸青藤碱的血液微透析 HPLC 色谱

A. 标准品; B. 空白微透析样品;

C. 空白微透析样品 + 对照品; D. 微透析样品

3.2 线性范围与标准曲线 以标准品浓度 (C) 对峰面积 (A) 进行线性回归,得回归方程 $C = 0.0059$

$A - 0.0011$ ($r = 0.9999$), 盐酸青藤碱浓度在 $0.011 \sim 0.706 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈良好的线性关系。

3.3 精密度与稳定性实验 以峰面积计算 RSD,结果表明对照品液的日内峰面积 RSD 分别为 0.98%, 0.76%, 0.52%, 日间峰面积 RSD 分别为 1.52%, 1.37%, 1.63%, 表明精密度良好。稳定性试验中,计算得到峰面积 RSD 为 1.61%。结果表明盐酸青藤碱溶液在实验时间内稳定。

3.4 大鼠一次肌注盐酸青藤碱溶液后的药动学参数 以盐酸青藤碱浓度对采样时间的中点作图,半对数药-时曲线见图 2; 血药浓度经过 Kinetica 药动学软件拟合,根据实测值与理论值的相关性、曲线拟合优度、AIC、SC 等指标,确定最佳房室模型,并求算房室模型和非房室模型的药动学参数。结果表明符合一级速率、一室开放模型; 房室与非房室模型药动学参数见表 1。

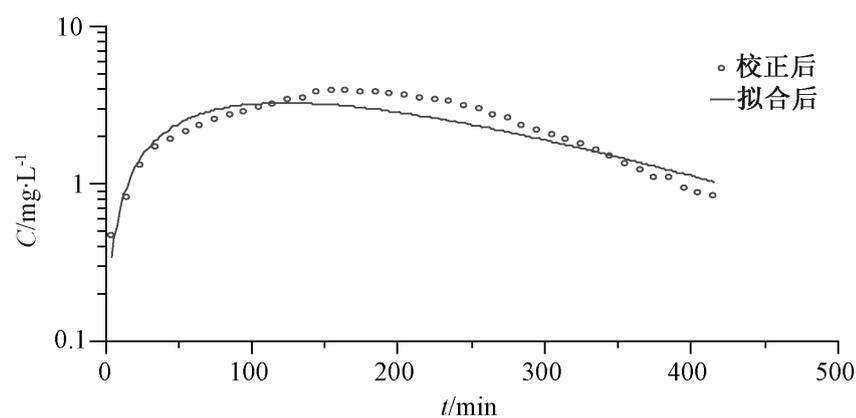


图 2 肌注盐酸青藤碱后的半对数血药浓度-时间曲线

表 1 盐酸青藤碱一次肌注给药后药动学参数平均值

(Weight = $1/C$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

房室模型参数	平均值	非房室模型参数	平均值
K_a / min^{-1}	9.599×10^{-3}	$C_{\text{max}} / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	3.127
$A / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	8.738	$T_{\text{max}} / \text{min}$	101.341
$\lambda / \text{min}^{-1}$	0.010	$\text{AUC}_{\text{tot}} / \text{min} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$	987.033
$K_{\text{el}} / \text{min}^{-1}$	0.012	$\text{AUMC}_{\text{tot}} / \text{min}^2 \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$	188.568
$T_{1/2 K_a} / \text{min}$	72.205	MRT/min	191.045
$T_{1/2} / \text{min}$	68.354	$T_{\text{half}} / \text{min}$	50.371
$T_{1/2 K_{\text{el}}} / \text{min}$	59.727		

4 讨论

肌肉注射,口服和静脉注射是 3 种不同的给药途径,相对于口服给药,肌注吸收时间短、起效快,相较于静脉注射给药则吸收时间又较长,药效也慢一些,但可以减缓静注的毒副反应。从药动学参数看,盐酸青藤碱肌注后达峰时间较长,半衰期约 50 min,平均滞留时间约 191 min,说明其吸收较为

缓慢,有助于缓解盐酸青藤碱的毒副反应和过敏反应,在本实验所采用的剂量下峰浓度约为 $3.127 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,血药浓度比较缓和,表明肌注是一种比较合适的给药方式。

药代动力学通过对体液(血液、尿液、泪液、胆汁、组织匀浆)等浓度的测定及药动模型的拟合,以参数的形式说明其体内过程。但常规的药动学采样手段相对单一,受采样间隔及体液量的制约,体内浓度变化非常迅速的药物体内信息可能不完整。具有“动态、实时、活体”采样为特征的微透析技术^[4]可以很好的弥补此缺点,获得更为完整的药动学信息。本实验将微透析技术应用于肌注后大鼠的血液采样,较好的反应了盐酸青藤碱肌注给药的药动学特征。

微透析技术进行药动学的研究有诸多独特之处,如对探针的选择与处理、透析液浓度的校正、真实浓度与采样间隔时间中点的对应关系等都体现出微透析样品的浓度实际上是在采样间隔内的平均值,故快流速、小样品体积、短的采样间隔、高通量分析必将成为微透析技术的发展趋势^[5]。微透析作为理想的药动学采样手段,其应用范围正在不断拓展中。

[参考文献]

- [1] 扈正桃,杨芳炬,黄继华,等. LHRH 药代动力学试验[J]. 四川生理科学杂志, 2005, 27(1): 9.
- [2] 李秀波,沈建忠,胡顶飞,等. 氟苯尼考静注及肌注在绵羊体内的药代动力学研究[J]. 畜牧兽医学报, 2003, 34(6): 609.
- [3] 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.
- [4] 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 Pharm Sci, 2007, 30(1): 75.
- [5] Martin Brunner, Hartmut Derendorf. Clinical microdialysis: Current applications and potential use in drug development[J]. Trends Analytical Chemistry, 2006, 25(7): 674.

[责任编辑 邹晓翠]