

二氢卟吩 e6 微透析回收率的体外测定方法及影响因素研究

徐月圆,凌家俊*,谢毅,王安元
(广州中医药大学中药学院,广州 510006)

[摘要] 目的:建立二氢卟吩 e6 微透析探针相对回收率(relative recovery,RR)的测定方法,并考察流速、浓度、温度、时间对 RR 的影响,为体内微透析研究提供实验依据。方法:利用浓度差法(增量法、减量法)进行二氢卟吩 e6 微透析探针体外回收率的比较研究,采用高效液相色谱仪(HPLC)测定二氢卟吩 e6 微透析取样后的浓度,利用探针回收率公式计算探针的 RR。结果:在同一浓度下,两种方法测定 RR 均随流速的增加而减少;增量法和减量法测得的 RR 一致;在同一流速下,浓度对 RR 的影响不大;RR 在 12 h 内保持稳定;RR 随温度的上升明显增加。结论:确定了影响微透析体外回收率的因素,利用减量法测定的探针回收率与增量法接近,反向透析法可作为体内微透析研究中的二氢卟吩 e6 回收率的测定方法。

[关键词] 二氢卟吩 e6;微透析;体外回收率

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0120-05

Study on the Relative Recovery of Chlorine-e6 in Microdialysis Probe and its Influence Factors

XU Yue-yuan, LING Jia-jun*, XIE Yi, WANG An-yuan
(College of Chinese Pharmacy, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the relative recovery (RR) of chlorine-e6 in microdialysis probe and to investigate the effect of the concentration, time and temperature on RR in chlorin-e6 microdialysis probe. **Method:** Gain method and loss method were used for the study. The concentration of chlorine-e6 in micro-dialysate samples was detected by HPLC and calculated probe RR with the formula used for the probe. **Result:** At the same concentration, RR decreased with the increase of the flow rate in the two methods. RR detected by gain method was similar to that detected by loss method. At the same flow rate, the concentration had no obvious effect on RR. RR kept steady within 12 hours, and increased obviously with the temperature. **Conclusion:** The influencing factors on RR in chlorin-e6 microdialysis probe are confirmed. The probe recovery obtained by gain method is similar to that by loss method. Retrodialysis can be used for the determination of the chlorine-e6 *in-vivo* recovery.

[Key words] microdialysis; chlorine-e6; relative recovery

[收稿日期] 20120612(019)
[基金项目] 广东省科学技术厅重点引导项目(2010B030700035);广东省科技计划项目(2009B030801035)
[第一作者] 徐月圆,硕士研究生,从事药物制剂新剂型与新技术研究, Tel: 15017558548, E-mail: 350117180@qq.com
[通讯作者] *凌家俊,教授,硕士生导师, Tel:020-39358043, E-mail: piglion88@gmail.com

微透析技术是利用物质扩散性质和半透膜选择透过原理设计的用于测定组织细胞外液中游离药物浓度的一种连续、实时、在体的新型瘤体组织取样技术。以透析原理为基础^[1],通过在瘤体中植入有带半透膜的探针,实现对实体瘤细胞外液中的内源性 及外源性化合物直接、连续取样,为肿瘤局部采样提供方便快捷的手段,是研究实体瘤局部药物代谢过程的一种新型工具。

二氢卟吩 e6 是以天然叶绿素为原料,通过现代

科技手段精制、提炼和修饰而得的单体四吡咯化合物,同时具有声敏及光敏的特性。它作为一种新型的声敏剂,具有低毒、声敏活性强、肿瘤组织高选择性及非肿瘤组织清除率高、光不良反应低等优点^[2-3],在光动力治疗黑素瘤中取得了较好的疗效^[3]。

将微透析采样应用于药物动力学研究成为目前微透析研究的热点,为了考察将微透析采样技术应用于二氢卟吩 e6 相关制剂体内药物动力学研究的可行性,优化体内微透析取样参数,本文进行了二氢卟吩 e6 微透析探针体外回收率及影响因素的研究。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Waters 高效液相色谱仪(Waters 515 泵,2487 检测器),瑞典灌注器推进泵(CMA402 Syringe Pump),线性探针(CMA30,膜长 10 mm,直径 0.24 mm,截留相对分子质量 6 000 D),灌注器(CMA 1.0 mL Exmire Microsyringe, MS-GAN100),AUW120D 型 1/10 万分析天平(日本岛津)。

1.2 试药 二氢卟吩 e6,由 EEC Bio-Tech (Guangzhou Co. Ltd.)提供,批号 VY08-595,纯度 > 95%,基本分子结构如图 1A 所示。二氢卟吩 e6 具光动力效应,经检测发现其在 400,653 nm(可见红光区)处有 2 个吸收峰(图 1B),无菌条件下用林格氏液避光溶解。

灌流液为 pH 7.4 的等渗林格氏液(Ringer's 液)分别称取 1.74 g 氯化钠,0.15 g 氯化钾溶解于 1 000 mL 量瓶中,用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液溶解并定容,用 0.22 μm 的水系微孔滤膜过滤即得,临用前配制。乙腈、水均为色谱级,其他试剂皆为分析级。

2 方法与结果

2.1 样品分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 Agilent HC-C₁₈ ODS 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),Phenomenex 保护柱,流动相乙腈-磷酸盐(60:40)(用磷酸调 pH 2.1),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 400 nm,柱温为室温。在此色谱条件下,二氢卟吩 e6 保留时间在 5.4 min 左右,峰形良好,无杂峰干扰测定,具有较高的特异性,分析条件可行,见图 2A。

2.1.2 阴性干扰试验 吸取 10 μL 的空白林格氏液注入高效液相色谱仪检测,在二氢卟吩 e6 的出峰位置无其他色谱峰,表明空白林格氏液不存在干扰,分析条件可行。见图 2B。

2.1.3 标准曲线与线性范围 精密称取二氢卟吩

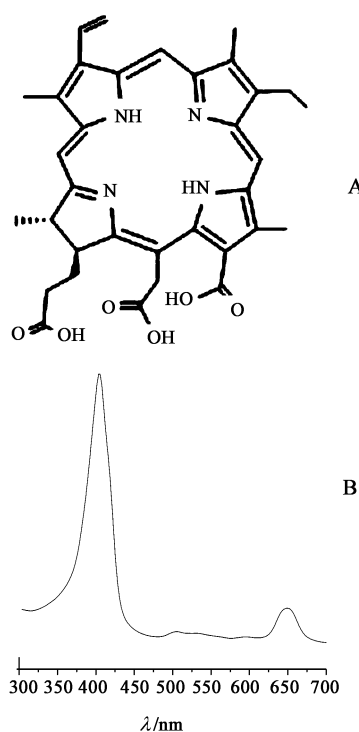
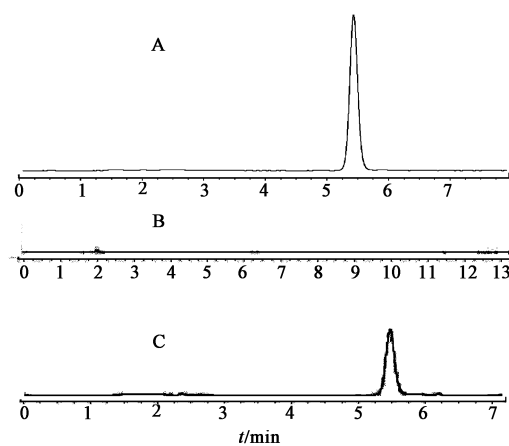


图 1 二氢卟吩 e6 分子结构式(A)及其紫外-可见光吸收光谱(B)



A. 二氢卟吩 e6; B. 空白林格氏液; C. 二氢卟吩 e6 经透析获得的样品

图 2 二氢卟吩 e6 HPLC

e6 1 mg,置于 100 mL 的量瓶中,林格氏液定容,摇匀,即得 10 mg·L⁻¹的浓储备液;精密量取储备液适量,加林格氏液稀释成质量浓度分别为 0.104, 0.52, 1.04, 2.08, 3.12, 5.2, 10.4 mg·L⁻¹,每个浓度进样 3 次,每次进样 10 μL ,在上述色谱条件下测定,以峰面积(Y)对进样浓度(X)进行线性回归,得回归方程 $Y = 50\,523X - 2\,048.4$ ($r = 0.999\,9$),结果表明二氢卟吩 e6 在 0.104 ~ 10.4 mg·L⁻¹ 呈良好的

线性关系。

2.1.4 精密度试验 以样品储备液配成 0.104, 1.04, 10.4 mg·L⁻¹ 3 个质量浓度进样测定, 每次进样 10 μL, 每个浓度测定 5 次, 连续 5 d 测定, 计算 RSD。结果日内精密度分别为 1.77%, 0.96%, 0.83%, 日间精密度分别为 5.83%, 1.13%, 2.01%, 表明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取浓度为 0.104, 1.04, 10.4 mg·L⁻¹ 的二氢吡吩 e6 溶液分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样测定, 每次进样 10 μL, 计算其 RSD 分别为 4.54%, 2.16%, 3.05%, 表明二氢吡吩 e6 在 24 h 内稳定性良好。

2.1.6 定量限与检测限 取样品储备液分别配制一系列浓度的二氢吡吩 e6 溶液, 进样测定, 每次进样 10 μL, 其检测限约为 5.2 pg (S/N = 3), 定量限约为 52 pg (S/N = 10)。

2.2 微透析实验方法

2.2.1 浓度差法 (减量法、增量法) 考察流速对回收率的影响 相对回收率是指微透析样品中待测物的浓度与探针周围外液的待测物浓度之比, 增量法计算相对回收率公式:

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

减量法计算相对回收率公式:

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

增量法: 将微透析探针浸于含有二氢吡吩 e6 1 mg·L⁻¹ 的林格氏液中, 利用不含药的林格氏液在不同流速下 (1, 2, 3, 4 μL·min⁻¹) 灌注探针, 每更换一种流速, 探针平衡 60 min, 每种流速收集 6 份透析液, 每份 15 μL。HPLC 测定透析液中样品药物浓度, 利用公式 1 计算回收率。结果见图 3。以回收率 RR 对灌注流速 *v* 的自然对数进行线性回归, 得回归方程为 $R = -16.849 \ln v + 26.888 (r = 0.960 2, n = 5)$ 。

减量法 (即体内研究中的反向透析法): 将探针浸于不含有二氢吡吩 e6 的林格氏液中, 用含药 1 mg·L⁻¹ 的林格氏液不同流速下 (1, 2, 3, 4 μL·min⁻¹) 灌注探针中, 每更换一种流速, 探针平衡 60 min, 每种流速收集 6 份透析液, 每份 15 μL。HPLC 测定透析液中样品药物浓度, 利用公式 2 计算回收率。结果见图 3。以回收率 RR 对灌注流速 *v* 的自然对数进行线性回归, 得回归方程为 $R = -16.671 \ln v + 27.157 (r = 0.994 3, n = 5)$ 。

结果表明, 增量法和减量法测得的二氢吡吩 e6 探针回收率随着流速的增加, 回收率呈指数下降的

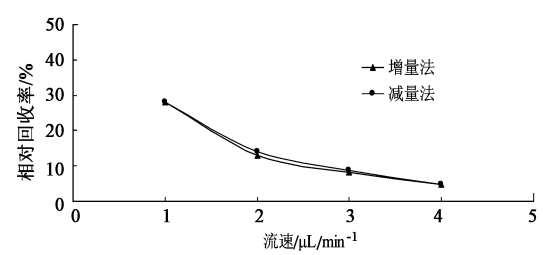


图 3 增量法、减量法测定不同流速对二氢吡吩 e6 微透析探针回收率的影响 (n = 5)

趋势; 且两种方法下测得的探针回收率在各流速下均保持一致, 这为反向透析法测定二氢吡吩 e6 体内回收率的可行性提供了实验依据。

2.2.2 不同浓度对回收率的影响 体内微透析试验中, 探针周围的药物浓度是实时变化的, 为了保证透析液中药物浓度变化能正确反映组织中药物浓度的变化, 探针回收率大小必须相对稳定。

将线性探针分别浸入质量浓度分别为 0.556, 1.112, 2.224, 4.448, 8.896 mg·L⁻¹ 的二氢吡吩 e6 林格氏液中, 以空白林格氏液 2 μL·min⁻¹ 流速灌注探针。每种浓度下平衡 60 min 后收集 6 份微透析液样品, 每份 15 μL, 测定透析液中的药物浓度。按增量法公式 1 计算回收率。测得五个浓度下的回收率为 (11.758 4 ± 0.444 7)%, RSD 3.78%, 表明二氢吡吩 e6 在 0.556 ~ 8.896 mg·L⁻¹, 回收率保持相对稳定, 与浓度无关, 呈浓度非依赖性, 见图 4。

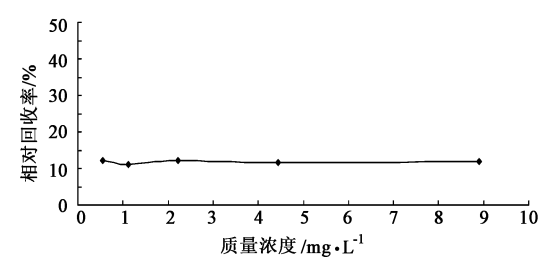


图 4 不同浓度对二氢吡吩 e6 微透析探针回收率的影响 (n = 5)

2.2.3 不同温度对回收率的影响 温度升高, 分子热运动增加, 增大了物质扩散进微透析膜中的几率, 回收率随之增加。

将线性探针浸入浓度为 4.448 mg·L⁻¹ 的二氢吡吩 e6 林格氏液中, 用恒温磁力搅拌器控制探针外液温度为 25, 32, 37, 42, 50 °C, 以空白林格氏液 2 μL·min⁻¹ 流速灌注探针, 每种温度下平衡 60 min 后收集 6 份微透析液样品, 每份 15 μL, 测定透析液中的药物浓度。按增量法公式 1 计算回收率。

结果表明, 二氢吡吩 e6 在 25 ~ 50 °C 随温度的

升高,探针回收率不断增大,25 ℃ 时 RR 为 $(7.722\ 6 \pm 0.007\ 2)\%$; 32 ℃ 时为 $(10.053\ 0 \pm 0.006\ 1)\%$; 37 ℃ 时为 $(11.396\ 8 \pm 0.011\ 0)\%$; 42 ℃ 时为 $(11.999\ 2 \pm 0.006\ 9)\%$; 50 ℃ 时为 $(12.613\ 4 \pm 0.005\ 7)\%$,见图 5。

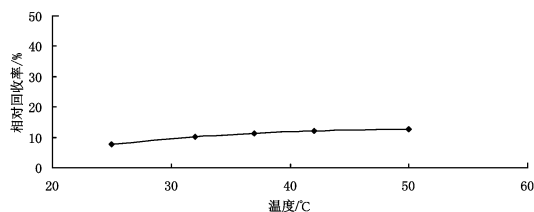


图 5 不同温度对二氢卟吩 e6 微透析探针体外回收率的影响

2.2.4 回收率的日内稳定性研究 体内微透析实验往往持续的时间较长,同一根探针需连续取样几个小时,且样品必须经过回收率的校正,故回收率必须保持相对稳定,否则会极大影响实验结果,甚至得出错误的结论^[4]。因此,需进行二氢卟吩 e6 回收率的稳定性考察。

将线性探针浸入浓度为 $4.448\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的二氢卟吩 e6 林格氏液中,以空白林格氏液 $2\ \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速灌注探针,每 15 min 收集一份透析液,共收集 12 h。按增量法公式 1 计算回收率。

结果表明,二氢卟吩 e6 微透析探针体外回收率在 12 h 内保持相对稳定,RR 为 $(11.221\ 58 \pm 0.788\ 2)\%$,RSD 7.02% (RSD < 10%),符合微透析采样的前提条件,见图 6。

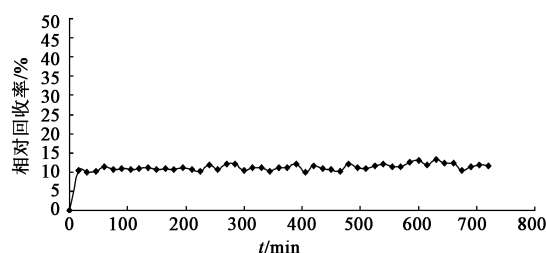


图 6 二氢卟吩 e6 微透析探针体外回收率日内稳定性

3 讨论

叶绿素本身对光、热、酸、碱、酶等理化因素极不稳定,二氢卟吩 e6 提取自叶绿素,外观为墨绿色粉末,极具吸湿性和易氧化性,故实验过程中为避免其降解损耗,必须避光操作,而且超声 (40 ~ 100 kHz) 处理可以加速药物溶解,对其稳定性无影响。本实验建立的 HPLC 法专属性强,准确度高,重复性好,适合于测定二氢卟吩 e6 的含量。

探针回收率是微透析研究的关键。回收率的大小受探针的性质 (如截流分子量、有效膜的长度

等)、待测物的性质 (脂溶性、蛋白结合率、分子大小等)、灌流液的性质 (亲脂性、pH 等)、灌流速度、温度等诸多因素的影响^[5],其中探针的截流相对分子质量一般为 18 000 ~ 20 000 D,分子截留量越低则物质越难以透过,探针的回收率越低,但分子截流量过大又会使透析液中含有太多的干扰成分而影响实验^[6],而且由于微透析探针直接植入体内,采用的灌流液是以氯化钠为主成分的电解质溶液,其水性特征决定了微透析技术适用于水溶性或极性物质的采样^[7]。传统的微透析灌流速度在 $0.5 \sim 2.0\ \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$,小分子物质的相对回收率一般在 10% ~ 40%^[8]。二氢卟吩 e6 不溶于水,相对分子质量为 596.67,实验采用的微透析线性探针的截留相对分子质量为 6 000 D,故二氢卟吩 e6 在体外实验中探针平均回收率较低,当流速为 $2\ \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,RR 为 11.22%。

在体内微透析实验中,由于探针外部的药物浓度是未知的,所以一般是通过反向透析法测定药物经过半透膜时的流失量来间接计算探针的回收率。反向透析法的理论基础就是基于探针的回收率等于探针的释放率这一假设的^[9]。在一般情况下,药物的回收率是等于其释放率的,但也有特殊情况^[10],因此在利用反向透析法测定某种药物的回收率之前,必须先验证其回收率与释放率是否相等 (通常可通过体外测定来完成),否则利用反向透析法测定回收率的结果是不可信的。同时回收率与透析媒介的浓度无关也是反向透析法测定体内回收率的基础。本研究通过体外实验证明了这两点,验证了反向透析法 (即浓度差法中的减量法) 作为测定二氢卟吩 e6 微透析回收率的可行性及合理性。

结果表明,当灌流液的流速一定时,浓度对相对回收率无影响;浓度一定时,流速与相对回收率成反比, $1\ \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速时,回收率最高,但是过低的流速需要较长的采样时间,将导致丢失部分的浓度变化的详细信息。因此,在保证足够灵敏度的前提下,尽量采用高流速;回收率随温度升高而增大,提示在实验过程中,要保持动物体温稳定,从而提高探针回收率的稳定性,保证结果的可靠性。

综合考虑回收率、流速、取样间隔、检测灵敏度等因素,体外试验中最终选择了 $2\ \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速及 7.5 min 的取样时间间隔,样品收集量为 $15\ \mu\text{L}$ 。这些参数可作为二氢卟吩 e6 局部微透析参数选择的参考,但其最佳参数组合还要根据体内研究结果才能确定。

浮小麦药材质量控制研究

孟霜¹,李慧峰²,闫艳²,张龙开²,崔健²,裴妙荣^{2*}

(1. 黑龙江中医药大学,哈尔滨 150040; 2. 山西中医学院,太原 030024)

〔摘要〕 目的:建立浮小麦药材的质量控制方法。方法:对浮小麦药材的性状鉴别、显微鉴别等方面进行生药学的研究;采用薄层色谱法(TLC)对浮小麦中 5-二十一烷基间苯二酚进行定性鉴别;采用高效液相色谱法建立浮小麦药材中 5-二十一烷基间苯二酚的含量测定方法。结果:对浮小麦的性状、显微特征进行了描述;薄层鉴别的色谱斑点清晰,特征性强,重复性好;在选定的高效液相色谱条件下 5-二十一烷基间苯二酚同其他成分达到较好的基线分离,5-二十一烷基间苯二酚在 129.5~259.0 ng 呈良好的线性关系, $Y=5.056.5X+201.5(r=0.9999)$;平均回收率为 101.26%,RSD 1.89%。结论:建立的方法简单易行、重复性好、结果准确,能有效鉴别和评价浮小麦药材,可作为浮小麦药材的质量控制方法。

〔关键词〕 浮小麦; 质量控制; 5-二十一烷基间苯二酚; HPLC

〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)24-0124-04

Criteria of Quality Control for *Triticum aestivum*

MENG Shuang¹, LI Hui-feng², YAN Yan², ZHANG Long-kai², CUI Jian², PEI Miao-rong^{2*}

(1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China;
2. College of Pharmacy, Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

〔收稿日期〕 20120411(006)
〔基金项目〕 山西省地方中药材标准研究项目(2011035A)
〔第一作者〕 孟霜,硕士,从事中药活性成分及质量标准研究, Tel: 14797174336, E-mail: mengzhaoshuang@126.com
〔通讯作者〕 *裴妙荣,教授,硕士,从事中药及复方药效物质基础研究, Tel:0351-2272180, E-mail: peimr602@163.com

〔参考文献〕

〔1〕 陈翔,凌家俊,陈亮. 烟碱微透析回收率的体外测定方法 & 影响因素研究〔J〕. 广州中医药大学学报, 2010,27(2): 159.

〔2〕 ANTOONG, LUDWIGM. Epidermal growth factor mediated targeting of chlorine-e6 selectively potentiates its photodynamic activity〔J〕. Cancer Res, 2000, 15(60): 2197.

〔3〕 SHELEG SV, ZHAVRIDEA, KHODINA TV, et al. Photodynamic therapy with chlorin-e6 forsk in metastases of melanoma〔J〕. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2004, 20(1): 21.

〔4〕 SasongkoL. Assessment of in vitro and in vivo recovery of gallamineusing microdialysis〔J〕. J Pharmacol Toxicol Methods,2000,44(3): 519.

〔5〕 晏亦林,叶勇,周莉玲,等. 磷酸川芎嗪微透析体外回收率的研究〔J〕. 中药新药与临床药理,2008,19(2):119.

〔6〕 张英丰,周莉玲. 温度及灌流液改性剂对青藤碱微透析探针体外物质转移系数的影响〔J〕. 广州中医药大学学报,2006,23(4): 332.

〔7〕 张英丰,吴阳,周莉玲,等. 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): 271.

〔8〕 聂颖兰,等. 微透析与现代分析技术在线联用的研究进展〔J〕. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5): 253.

〔9〕 凌家俊,周莉玲,谢波. 微透析探针的重复利用性及线性探针的可行性研究〔J〕. 广州中医药大学学报, 2008, 25(3): 265.

〔10〕 Plock N, Buerger C, Kloft C. Successful management of discovered pH dependence in vancomycin recovery studies novel HPLC method for microdialysis and plasma samples〔J〕. Biomed Chromatogr,2005, 19: 237.

〔责任编辑 顾雪竹〕