

血液微透析法结合液质联用的丹参水煎液清醒动物多次给药药动学研究

朱黎霞¹, 张英丰^{2*}

1. 南方医科大学珠江医院 中医科, 广东 广州 510282

2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 采用血液微透析技术进行丹参水煎液清醒动物多次 ig 给药的药动学研究。方法 以丹参水煎液为工具药物, 以丹参素为评价指标, 以清醒家兔为实验动物, 结合微透析采样技术和液质检测技术, 进行日内多次给药的药动学研究, 以非房室模型获取药动学参数。结果 建立了基于微透析法的清醒动物汤剂多次给药的药动学研究模式, 完整采集了整个过程的药动学信息, 方法稳健、可靠、简便。结论 此模式可为类似研究提供借鉴。

关键词: 血液微透析法; 丹参水煎液; 液质联用; 多次给药; 药动学

中图分类号: R285.51 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)15-2206-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.15.016

Pharmacokinetic study on Danshen Decoction with multiple dosing to awake animal by blood microdialysis method combined with LC-MS

ZHU Li-xia¹, ZHANG Ying-feng²

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Zhujiang Hospital, South Medical University, Guangzhou 510282, China

2. College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To carry out the pharmacokinetic study in awake animal after multiple dosing of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) Decoction by blood microdialysis method combined with LC-MS. **Methods** The pharmacokinetic study was carried out with awake rabbits as experimental animal, Danshen Decoction as tool drug, and Danshensu as evaluation index combining with microdialysis sampling and LC-MS detection technology after intraday multiple dosing. The pharmacokinetic parameters were obtained by non-compartmental model method. **Results** The pharmacokinetic study pattern of multiple dosing was established in awake animal, and the whole process dynamic characteristics were collected. The method was stable, reliable, and simple. **Conclusion** This study can make the reference to similar study for other drugs.

Key words: blood microdialysis method; Danshen Decoction; liquid chromatography-mass spectrometry; multiple dosing; pharmacokinetics

中药汤剂在临床中应用广泛, 约占中医院临床处方的 50%。由于汤剂以液体形式给药, 吸收快、起效迅速、滞留时间短, 常需要日内多次给药方可达到良好疗效。单次给药和多次给药的药动学特征存在差异, 目前已有关于中药汤剂单次给药的药动学研究^[1], 但中药汤剂短期(日内)多次给药的药动学研究较少报道。

丹参在心脑血管疾病中的疗效已得到充分肯定^[2], 丹参素为其主要活性成分之一。本实验拟以丹参水煎液为工具药物, 结合血液微透析采样技术

和液质联用检测方法, 对丹参水煎液进行清醒家兔日内多次给药的药动学研究, 建立基于微透析法的清醒动物多次给药的药动学研究模式, 为中药汤剂多次给药药动学研究提供借鉴与参考。

1 材料

1.1 仪器

Finnigan TSQ Quantum ACCESS 型液相色谱-三重四极杆串联质谱仪(Finnigan Surveyor LC 泵, Surveyor AS 自动进样器, ESI 电喷雾离子化电离源, 真空脱气机, 温控柱温箱, 温控样品室, Xcalibur 2.0

收稿日期: 2014-03-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30701097)

作者简介: 朱黎霞, 主治医师。Tel: (020)61643456 E-mail: zhulx2007@163.com

*通信作者 张英丰, 副教授, 从事生物药剂学与药物动力学研究。Tel: (020)39358043 E-mail: zyfeng-2006@163.com

数据处理系统); BP211D 万分之一精密天平 (Sartorius Company)。美国 BAS 公司微透析系统: MD0100 灌注器、MD1001 灌注器推进泵、MD1002 灌注器支架、MD1000 流速控制器、CMA/20 Elite 血液微透析探针 (透析膜长度为 10 mm, 截留相对分子质量为 20 000)。

1.2 药品与试剂

丹参素 (供测定用, 质量分数 98%, 批号 110855-200809, 中国食品药品检定研究院); 乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher 公司); 氯化钠、氯化钾等为分析纯; 丹参水煎液 (自制, 经 HPLC-UV 测定, 含丹参素 24.69 $\mu\text{g/mL}$)。

1.3 实验动物

健康新西兰兔, 雄性, 体质量 (2.6 ± 0.2) kg, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (粤) 2008-0020。

2 方法

2.1 丹参水煎液的制备

丹参药材由广州致信药业公司提供, 经广州中医药大学张英丰副教授鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge. 的干燥根茎。丹参水煎液制备方法: 取丹参饮片 30 g, 30 倍蒸馏水浸渍 30 min, 快速加热至药液沸腾后, 保持微沸 30 min, 分离煎出液, 药渣再加入 10 倍蒸馏水重复以上操作, 合并煎出液。煎出液冷却后 3 000 r/min 离心 10 min 以沉淀不溶物, 获得澄清药液, 备用。

2.2 分析条件

色谱条件: Agilent Zorbax SB-Aq C_{18} 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μm), 流动相乙腈-水 (40:60, 含 0.05% 甲酸), 体积流量 0.15 mL/min, 样品温度 4 $^{\circ}\text{C}$, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积 10 μL 。

质谱条件: ESI 离子源, 喷雾电压 3 000 V; 鞘气压力 206.85 kPa (30 psi), 辅助气压力 55.16 kPa (8 psi), 毛细管温度 350 $^{\circ}\text{C}$, N_2 体积流量 9 L/min。离子检测方式: 选择性反应监测 (SRM), 离子对为 197 $\rightarrow$ 135 (18 eV), 负离子模式。

2.3 丹参水煎液家兔血液微透析采样研究方案

2.3.1 Ringer 液的配制 精密称取 8.631 g NaCl、0.263 g CaCl_2 、0.305 g KCl 置于 1 000 mL 量瓶中, 去离子水定容至刻度, 摇匀, 用 0.2 μm 水系微孔滤膜滤过, 即得 Ringer 液。现用现配。

2.3.2 家兔血液微透析探针的植入 家兔固定于兔盒内暴露双耳, 耳缘皮肤局部麻醉后, 酒精擦拭

耳缘静脉使其扩张, 用注射器针头刺入耳缘静脉后拔出针头, 手持血液微透析探针的固定翼迅速将探针插入针孔并向前推进, 使探针活性膜浸润于血液内, 医用胶布固定。整个采样过程中, 防止探针脱落、滑动, 如家兔有痛感、挣扎或麻醉效力即将消失时, 酌情补充局部麻醉。

2.3.3 给药剂量及采样间隔 家兔植入血液微透析探针后以 2.5 $\mu\text{L/min}$ 灌流空白 Ringer 液平衡 0.5 h。按 16 mL/kg ig 给药, 单次给药丹参素量为 395.04 $\mu\text{g/kg}$, 3 次给药间隔时间均为 8 h, 首次给药完毕作为零时间点开始收集样品, 空白 Ringer 液灌流体积流量保持 2.5 $\mu\text{L/min}$, 每 15 分钟收集 1 份, 连续采集直至实验结束。每份样品体积均为 37.5 μL , 置于 100 μL EP 管内、-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测。

2.3.4 体内回收率的测定 末次给药样品采集结束后继续灌流空白 Ringer 液 1 h, 然后更换含 105 ng/mL 丹参素的 Ringer 液继续灌流 1.5 h, 体积流量和收集方式同“2.3.3”项, 其中前 3 份标本弃去, 后 3 份标本进样测定。以灌流液和透析液浓度差值与灌流液浓度比值为体内回收率进行微透析样品浓度校正。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系 临用前精密称定适量丹参素对照品溶于 Ringer 液内作为母液。取丹参素母液配制成 4.20、8.40、21.00、42.00、84.00、105.00、210.00、252.00 ng/mL 的对照品溶液, 均分别进样 10 μL 测定。以丹参素色谱峰面积为纵坐标, 丹参素质量浓度为横坐标, 加权 ($1/X^2$) 最小二乘法进行回归运算, 绘制标准曲线。结果得到丹参素的线性回归方程为 $A = 892.875 C + 163.673$ ($R^2 = 0.9997$, 权重为 1), 质量浓度在 4.20~252.00 ng/mL 呈良好线性关系, 定量限约为 2 ng/mL。

2.4.2 专属性考察 家兔植入血液微透析探针后以 2.5 $\mu\text{L/min}$ 体积流量灌流空白 Ringer 液, 得到空白透析液, 分别进样空白透析液、丹参素对照品溶液与给药后微透析液, 液质联用检测。在此分析条件下, 空白透析液基线噪音较小, 丹参素峰形良好, 保留时间约为 3.2 min, 专属性较好。色谱图见图 1。

2.4.3 精密度试验 取质量浓度分别为 4.20、42.00 和 252.00 ng/mL 的丹参素质控样品液各 5 份进样测定, 一日内连续进样 5 次, 连续进样 5 d, 计算日内精密度和日间精密度。结果日内、日间精密度 RSD 均小于 3%, 表明仪器精密度良好。

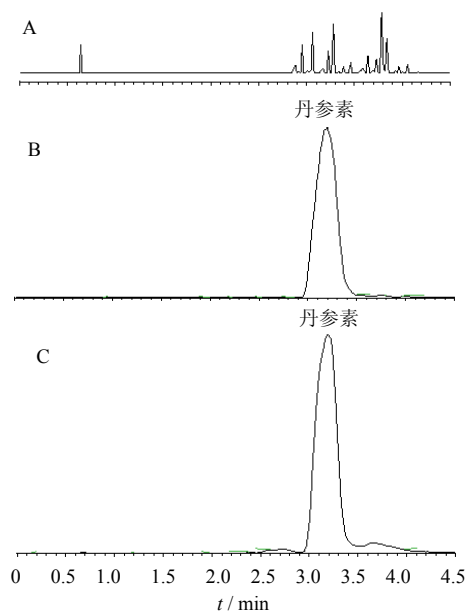


图1 空白微透析液 (A)、丹参素对照品 (B) 和家兔微透析液样品 (C) 色谱图

Fig. 1 Chromatograms of blood microdialysis for blank microdialysis sample (A), danshensu reference substance (B), and rabbit blood sample (C)

2.4.4 稳定性考察 取 4.20、42.00 和 252.00 ng/mL 丹参素对照品溶液, 分别考察于 4 °C 放置 2、6、8、24、48 h, 样品 30 d 内 -70 °C 冰冻以及冻融稳定性。结果 4 °C 保存下高、中、低 3 个质控浓度的 RSD 均小于 2%, 表明微透析样品短期存放稳定性较好。样品在 -70 °C 冰冻环境下能稳定放置, 高、中、低 3 个质量浓度在反复 3 次冻融后的测定结果 RSD 均小于 2.0%, 这表明样品在反复冻融 3 次后仍保持稳定。

表1 丹参水煎液家兔多次给药的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of Danshen Decoction after multiple dosing to rabbits ($\bar{x} \pm s, n = 5$)				
参数	单位	第1次给药	第2次给药	第3次给药
$C_{\max}$	ng·mL ⁻¹	195.89	200.47	215.23
$t_{\max}$	h	1.125	0.875	0.875
AUC_{0-t}	h·ng·mL ⁻¹	419.534	507.24	559.764
$AUC_{0-\infty}$	h·ng·mL ⁻¹	424.593	509.816	569.999
L_z	h ⁻¹	1.057	1.863	0.580
$AUMC_{0-t}$	h·ng·mL ⁻¹	914.094	1 222.285	1 329.322
$AUMC_{0-\infty}$	h·ng·mL ⁻¹	952.394	1 242.024	1 427.551
$t_{1/2}$	h	0.655	0.372	1.194
MRT	h	2.243	2.436	2.504
CL	h·mL	1 860.79	1 549.74	1 386.11
V_z	mL	1 759.57	831.678	2 388.29

2.5 数据处理

微透析样品通过体内回收率校正后得到真实的血药浓度, 每只家兔微透析样品浓度均进行体内回收率校正 (透析液样品浓度与体内回收率的比值作为最后的血药浓度), 以 Kinetica4.4.1 药动学软件 (美国 Thermo Electron 公司) 进行药动学参数分析。

3 结果

以丹参素血药浓度对采样时间的中点 (即采样间隔内的起始时间与终止时间的平均值) 作图, 平均血药浓度-时间拟合曲线见图 2, 采用 Kinetica4.4.1 药动学软件 “multi micro extravascular 模块”, 按非房室模型提取参数, 所得药动学参数见表 1。

4 讨论

微透析技术有别于传统药动学研究方法, 可长时间、低损伤的采集小体积样品, 特别适用于多次给药的全程采样。微透析技术通过膜分离、膜纯化原理进行药动学的动态采样, 集 “采样” 和 “纯化” 为一体, 对动物创伤小、不损耗体液而在多次给药的药动学研究中具有特殊重要性。

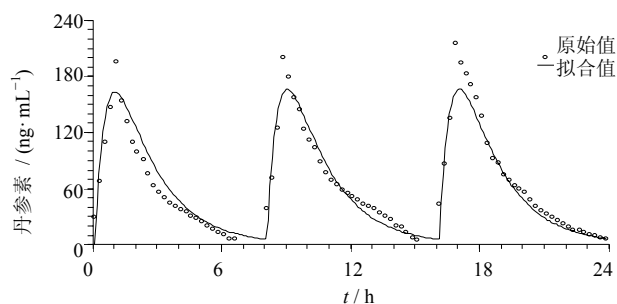


图2 丹参水煎液多次给药后丹参素药-时曲线
Fig. 2 Concentration-time curve of Danshen Decoction after multiple dosing

丹参活性成分众多,包括亲水性成分丹参素、原儿茶醛、原儿茶酚、丹参酸B等,亲脂性成分丹参酮I、丹参酮II_A、隐丹参酮等。在检测指标选取上,鉴于微透析探针水性灌流液对亲脂性成分的天然排斥,只能选择水溶性成分。在水溶性成分群中,丹参素稳定性好、质谱灵敏度高、分析时间短,故在本实验中选取丹参素为检测指标。

为便于给药,在满足检测的前提下采用40倍水煎煮获得丹参水煎液,并以此为工具药,采用“实时、活体、动态、微创”采样的血液微透析技术,结合液质联用检测,建立了汤剂日内多次给药的药动学研究模式。从本研究看出,日内多次给药后血药浓度波动明显,具有典型的“峰谷现象”,首次给药后6h就难以检测。经多次给药后消除相能检测的样品数量增多,丹参素达峰浓度逐渐增加,平均滞留时间依次延长。

目前常用血药浓度法进行多次给药的药动学研究,但因为需要长时间频繁采血而扰乱正常生理机能,对家兔、小鼠等小动物影响较大而难以实现全程采样。本研究建立了短期多次给药的药动学研究模式,有别于血药浓度法采集前几个给药期的谷浓度样品,末次给药采集代表性时点样品的方法^[3]:

小动物、给药周期短、在一天内采集所有样品、动物处于清醒状态、减少麻醉对实验动物的影响,通过对体内过程的全程采样,可以有效避开血药浓度法因采样时间设置而信息缺失的现象。

因技术所限,本研究所用动物为家兔,从生理解剖结构上和人体有所差异。如能借鉴吕良等^[4]所建立的清醒大鼠血液微透析方法,结合清醒动物活动装置,可实现大鼠长时间、大样本、清醒自由活动状态下重复给药的药动学研究。

参考文献

- [1] 韩刚,肖倩,索炜,等.大承气汤中大黄酸在大鼠体内的药动学研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(18):137-140.
- [2] 杨志霞,林谦,马利.丹参对心血管疾病药理作用的文献研究[J].世界中西医结合杂志,2012,7(2):93-96.
- [3] 陈伟,孟令阔,樊冬娇.盐酸小檗碱单次和多次给药在Beagle犬体内的药动学[J].沈阳药科大学学报,2011,28(7):512-516.
- [4] 吕良,张恒义.在体血管微透析技术的建立及对大鼠体内丹参素药动学参数的研究[J].中国药理学杂志,2010,45(11):849-852.