

栀子苷脑血微透析探针大鼠体内外试验回收率研究*

陈腾飞, 刘建勋**, 林力, 张颖, 宋文婷

(中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 中药药理北京市重点实验室, 北京 100091)

摘要 目的: 考察栀子苷脑微透析探针和血微透析探针的大鼠体内外回收率及其稳定性。方法: 采用 LC-MS/MS 法测定大鼠脑、血微透析液中栀子苷的浓度; 采用正透析法和反透析法考察不同灌流速度、正透析法考察不同栀子苷浓度 (50、200、500、1 000 ng·mL⁻¹) 及探针使用次数对体外回收率的影响; 反透析法考察大鼠体内探针回收率稳定性及灌流速度对回收率的影响, 并与体外结果进行比较。结果: 栀子苷的脑、血探针体内外回收率均随着灌流速度 (0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 μL·min⁻¹) 的增加而降低, 不同流速下体外正透析法测得的脑、血液探针回收率分别为 (48.0±3.4)%、(31.0±2.3)%、(20.4±1.3)%、(17.3±0.8)%、(7.9±0.7)% 和 (83.0±5.9)%、(56.2±5.2)%、(39.1±3.1)%、(30.4±2.6)%、(26.4±1.9)%; 正透析法和反透析法所测得的体外回收率在相同条件下基本一致, 且反透析法测得的体内回收率与体外结果基本一致; 脑、血探针体内回收率在 10 h 内的稳定性均良好, 平均回收率分别为 23.4% 和 42.6%; 脑、血探针回收率与栀子苷的浓度无关; 使用不超过 3 次的探针, 经过恢复处理后, 仍然能够保持较高的透过率。结论: 反透析法能够作为研究栀子苷体内回收率的测定方法, 微透析技术能够用于栀子苷脑细胞间液药代动力学、血液药代动力学的同步研究。

关键词: 栀子苷; 微透析探针; 生物活体取样技术; 回收率; 脑细胞间液; 药代动力学; 液相色谱串联质谱

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2018)03-0425-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.03.08

Study on recovery rate of geniposide brain blood microdialysis probe *in vitro* and *in vivo* in rats*

CHEN Teng-fei, LIU Jian-xun**, LIN Li, ZHANG Ying, SONG Wen-ting

(Institute of Basic Medical Sciences, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Material Medica, Beijing 100091, China)

Abstract Objective: To investigate the recovery rate and stability of geniposide brain and blood microdialysis probe *in vitro* and *in vivo* in rats. **Methods:** The concentrations of geniposide in rats, brain and blood microdialysates were determined by LC-MS/MS. In order to study the effect on recovery *in vitro*, the different flow rates were investigated by dialysis and reverse dialysis, drug concentrations (50, 200, 500 and 1 000 ng·mL⁻¹)

* 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (2015-CB554405); 中国中医科学院科技创新团队 (YS1303); 国家自然科学基金面上项目 (81673587)

** 通信作者 Tel: (010) 62875601; E-mail: jianxun_liu@163.com

第一作者 Tel: (010) 62835618; E-mail: flychen04@126.com

and the number of probes used were investigated by dialysis. The stability of the rats probe recovery and flow rate on the recovery rate *in vivo* were determined by reverse dialysis, and the results compared with that of *in vitro* trials. **Results:** The *in vitro* and *in vivo* recovery rate of brain and blood probe of geniposide were decreased with the increase of flow rate (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 3.0 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$). The dialysis recovery of brain and blood probe *in vitro* were (48.0 $\pm$ 3.4)%, (31.0 $\pm$ 2.3)%, (20.4 $\pm$ 1.3)%, (17.3 $\pm$ 0.8)%, (7.9 $\pm$ 0.7)% and (83.0 $\pm$ 5.9)%, (56.2 $\pm$ 5.2)%, (39.1 $\pm$ 3.1)%, (30.4 $\pm$ 2.6)%, (26.4 $\pm$ 1.9)%, respectively. *In vitro* recovery obtained by dialysis and reverse dialysis were approximately equal under the same condition, and the *in vivo* recovery determined by reverse dialysis was similar with the *in vitro* results. The recovery of brain and blood microdialysis probe showed a good stability within 10 h, and the average recovery of brain and blood probe for geniposide were 23.4% and 42.6%, respectively. The recovery rate of the brain and blood probe was not related to the different concentrations of geniposide, and the high transmittance can still be able to be maintained after the recovery of the probe which was used no more than 3 times. **Conclusion:** The reverse dialysis method can be used to study probe recovery *in vivo*, and microdialysis technique can be used for the simultaneous study of pharmacokinetic of geniposide in brain cells and blood.

Keywords: geniposide; microdialysis probe; recovery; intercellular fluid of brain; pharmacokinetic; LC-MS/MS

中药栀子为茜草科植物栀子 (*Gardenia jasminoides* Ellis) 的干燥成熟果实,其主要成分为栀子苷 (geniposide),又称为京尼平苷,属于环烯醚萜苷类成分,其苷元为京尼平^[1]。现代药理研究表明栀子苷具有抗炎^[2-3]、保肝^[4-5]、抗氧化^[6]等作用,近年来对其在治疗脑血管疾病,如脑缺血保护^[7-8]及治疗阿尔兹海默病^[9-10]等方面也有了一定的研究。

微透析是近年来迅速发展的一种生物活体取样技术,它能够在不破坏生物体内环境的前提下,实现对生物体细胞间隙内源性和外源性物质的直接取样^[11]。该技术基于透析的原理^[12-13],将具有半透膜尖端的探针植入到相应组织或部位,用微量注射泵灌注灌流液,内源性和外源性小分子物质能够沿浓度梯度扩散到半透膜的另一侧,而蛋白质、酶等大分子则无法透过,收集的样品可以不经预处理直接进行测定,计算透析液中的药物或者内源性物质的浓度,再通过对探针体内外回收率进行系统性的研究,根据回收率来计算目标组织或部位细胞间隙游离的药物以及内源性物质的浓度,以完成后续药代动力学、药效动力学的研究^[14]。栀子苷作为一种常用的、有多方面药理作用的中药成分,关于其微透析及回收率方面的研究,目前文献报道较少,为了进一步研究栀子苷的脑细胞间液药代动力学及其与血液药代动力学相关性,本文对栀子苷的脑、血微透析探针体内外回收率开展了研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器

API4000 Q-TRAP 型三重四极杆串联质谱仪,配有 Turbo VTM 离子源仓、离子喷雾和大气压电离离子源及 Analysis 1.4.2 数据处理系统 (Applied Biosystem 公司); SYMBIOSISTM PICO 在线固相萃取 SPE-LC 联用系统 (Spark Holland 公司); 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ (150 mm $\times$ 2.1 mm, 5 μm ; 填料为十八烷基硅烷键合硅胶, Waters 公司); CMA 12/4 mm 脑微透析探针及套管、CMA 20/10 mm 血液微透析探针、CMA 402 微透析泵 (CMA 公司); 68001 型大鼠立体定位仪 (Stoelting 公司); MS1 Minishaker 涡流混合器 (IKA 公司); B5200S-DT 型超声清洗机 [必能信超声 (上海) 有限公司]; AG-245 分析天平 (Mettler Toledo 公司); Integral 3 型超纯水系统 (Millipore 公司)。

1.2 材料与试剂

栀子苷对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 110749-201316, 20 mg, 含量 97.5%); 玻璃离子体水门汀 (上海医疗器械股份有限公司); 肝素钠注射液 (临用前用生理盐水配成体积分数 2% 的溶液, 常州千红生化制药股份有限公司, 批号 150911, 规格 2 mL/12 500 单位); 复方氯化钠注射液 (林格氏液, 华润双鹤药业股份有限公司, 批号 D201407173, 规格 500 mL); 甲醇、乙腈 (色谱纯, Merck 公司); 甲酸 (色谱纯, J.T.BAKER 公司); 娃哈哈饮用纯净水 (用于流

动相配制,杭州娃哈哈集团有限公司);超纯水(用于微透析实验);其他试剂均为市售分析纯。

1.3 实验动物

SPF级SD大鼠,雄性,240~280 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2012-0001。本实验均符合北京实验动物福利伦理审查指南的相关要求。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 质谱条件 电喷雾离子化(ESI);正离子检测;多反应监测(MRM);离子喷射电压5.5 kV;源内气体1:0.28 MPa;源内气体2:0.34 MPa;源内温度550 °C;气帘气体:0.1 MPa;用于定量的栀子苷的离子通道为 m/z 406.200~227.100。

2.1.2 色谱条件 采用外标法定量,色谱柱为Waters Symmetry C₁₈(150 mm×2.1 mm, 5 μm),流动相A为水-甲醇-乙腈(9:0.5:0.5, 0.01%甲酸),B为甲醇-乙腈(1:1, 0.01%甲酸, 1%水),梯度洗脱(0~0.2 min, 63%A; 0.2~1 min, 63%A→30%A; 1~4.8 min, 30%A; 4.8~6.8 min, 30%A→63%A),流速为0.23 mL·min⁻¹,柱温25 °C,进样器温度4 °C,进样10 μL。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液 取栀子苷对照品约4 mg,精密称定,置1.5 mL离心管中,精密加入甲醇1 mL,涡旋混合,得相应浓度的栀子苷甲醇溶液,用甲醇稀释为10 μg·mL⁻¹的栀子苷溶液,再用甲醇将10 μg·mL⁻¹的栀子苷溶液依次稀释成栀子苷质量浓度为5 000、4 000、1 000、250、120和40 ng·mL⁻¹的对照品储备液,临用前分别以林格氏液将上述6个质量浓度的对照品储备液稀释10倍,得质量浓度为500、400、100、25、12和4 ng·mL⁻¹的栀子苷对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取栀子苷对照品约5 mg,精密称定,置50 mL量瓶中,加林格氏液溶解后定容至刻度,得100 μg·mL⁻¹栀子苷溶液,再用林格氏液将其稀释成质量浓度分别为1 000、500、200、100、50 ng·mL⁻¹的微透析实验用栀子苷溶液,临用前新鲜配制。

2.2.3 样品处理 取25 μL的栀子苷对照品溶液、微透析实验用栀子苷溶液及微透析样品,分别加入等体积的40%甲醇,涡旋混匀后进样10 μL。

2.3 脑、血液微透析探针的植入

2.3.1 脑微透析探针 大鼠腹腔注射4%的水合氯醛(10 mL·kg⁻¹)麻醉,备皮,切开头部囟门附近的

皮肤,钝性分离皮下组织并擦净,暴露骨面。用立体定位仪固定大鼠头部,找出纹状体对应的点(前囟前后+0.05 cm,中缝左右-0.30 cm,颅骨平面上下-0.40 cm)并用牙科钻打孔,在钻孔点植入脑微透析探针套管,另钻两孔拧入螺丝钉,用牙科水泥将套管连同2个螺钉一并固定。待牙科水泥牢固后,松开立体定位仪,洒入少量注射用青霉素钠粉末,手术区域前后各缝皮1针。术后观察24 h,正常进水进食。实验时先将探针置于超纯水中浸泡约30 min后,以林格氏液或者一定浓度的微透析实验用栀子苷溶液灌流,排出气泡;取出已植入的探针套管的假针,小心插入准备好的微透析探针,以一定的灌流速度,开始微透析^[15]。

2.3.2 血液微透析探针 首先将血液探针置于超纯水中浸泡约30 min,之后置于2%肝素钠溶液中,以2 μL·min⁻¹的流速灌流2%肝素钠约30 min。大鼠腹腔注射4%水合氯醛(10 mL·kg⁻¹)麻醉,在腹部中线靠左约0.5 cm、锁骨附近,备皮,纵向剪口约1.5 cm,找出并钝性分离颈静脉,结扎远心端,在远心端剪一小口,将血液探针朝心脏方向插入约2.4 cm,与两旁的肌肉组织缝合以固定探针,缝皮;继续以2 μL·min⁻¹的流速灌流2%肝素钠溶液约30 min,之后灌流液更换为林格氏液或者一定浓度的微透析实验用栀子苷溶液,以一定的灌流速度,开始微透析^[16]。

2.4 专属性试验和基质效应

2.4.1 专属性试验 大鼠植入脑、血微透析探针并开始微透析,分别以1.5 μL·min⁻¹的流速灌流林格氏液,各自平衡60 min后,收集空白脑、血微透析液;之后灌流质量浓度为100 ng·mL⁻¹的微透析实验用栀子苷溶液,各自平衡60 min后,收集脑、血微透析液。样品处理后进行测定,结果见图1。结果表明栀子苷的峰形良好,保留时间约2.8 min,脑、血空白透析液中未见影响栀子苷测定的干扰物。

2.4.2 基质效应考察 取6只SD大鼠,分别各自植入微透析探针并开始微透析,分别以1.5 μL·min⁻¹的流速灌流林格氏液,各自平衡60 min后,收集空白微透析液适量。分别精密吸取20 μL质量浓度为120、1 000、4 000 ng·mL⁻¹的栀子苷对照品储备液(每个浓度分2组,每组6份),分别加入180 μL的林格氏液、空白微透析液,涡旋混匀,样品处理后进行测定,分别记录峰面积为A₁、A₂,计算基质效应,见表1。结果说明,微透析液中的栀子苷基本无基质效应。

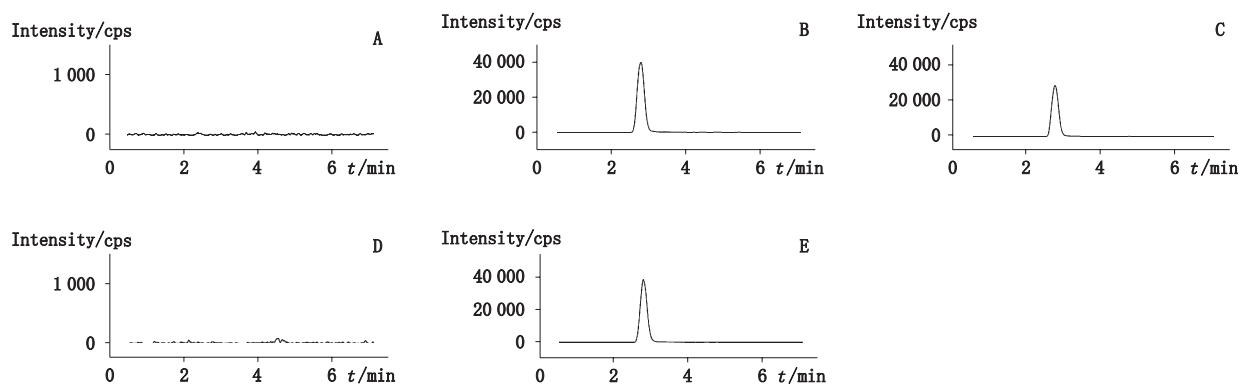


图1 大鼠微透析样品中栀子苷测定的 HPLC-MS/MS 图
A. 空白脑微透析液 (blank brain microdialysis sample) B. 含药脑微透析液 (brain microdialysis sample containing geniposide) C. 栀子苷对照品溶液 (100 ng·mL⁻¹ geniposide standard solution) D. 空白血液微透析液 (blank blood microdialysis sample) E. 含药血液微透析液 (blood microdialysis sample containing geniposide)

图1 大鼠微透析样品中栀子苷测定的 HPLC-MS/MS 图

Fig. 1 HPLC-MS/MS chromatograms of geniposide in rats microdialysis samples

表1 栀子苷基质效应 (n=6)

Tab. 1 Matrix effect of geniposide

C/(ng·mL ⁻¹)	A ₁ /A ₂ /%					
	1	2	3	4	5	6
12	96.3	102.9	98.6	96.8	90.4	96.8
100	99.3	99.6	97.2	89.9	95.7	96.1
400	93.5	100.0	94.2	98.0	91.6	95.3

2.5 线性范围及最低定量限

取质量浓度为 4、12、25、100、400、500 ng·mL⁻¹ 的栀子苷对照品溶液,按“2.2.3”项下方法处理后依

次进样分析,以各成分的峰面积 (Y) 为纵坐标,质量浓度 (X) 为横坐标,按 (1/X²) 加权线性回归,得栀子苷回归方程:

$$Y=2\,420\,X-1\,770 \quad r=0.999\,6$$

线性范围 4~500 ng·mL⁻¹, 定量下限为 4 ng·mL⁻¹ (S/N>10)。

2.6 精密度和准确度试验

依次制备低中高 (12、100、400 ng·mL⁻¹) 3 个质量浓度的栀子苷对照品溶液,按“2.2.3”项下方法处理后进行测定,1 d 内平行操作 5 次考察日内精密度和准确度,连续 3 d 考察日间精密度和准确度,精密度和准确度分别用 RSD 和 RE 表示,见表 2。

表2 栀子苷精密度和准确度测定结果 (n=5)

Tab. 2 Precision and accuracy results of geniposide

C/(ng·mL ⁻¹)	日内 (intra-day) /%			日间 (inter-day) /%		
	精密度 (precision), RSD	RE	准确度 (accuracy)	精密度 (precision), RSD	RE	准确度 (accuracy)
12	3.4	7.3	92.7	6.1	4.4	93.4
100	5.7	4.2	104.2	6.1	0.1	103.4
400	2.2	5.6	94.4	5.1	7.5	94.3

2.7 稳定性试验

取质量浓度依次为 12、100、400 ng·mL⁻¹ 的栀子苷对照品溶液,每个浓度 5 份,按“2.2.3”项下方法处理后进行测定,12 h 后再次测定,考察 12 h 稳定性。另取低中高 3 个浓度的栀子苷对照品溶液,每个浓度 5 份,在 -80 ℃ 条件下放置 3 个月后,按“2.2.3”项

下方法处理后进行测定,考察 3 个月稳定性,见表 3。结果表明微透析液中的栀子苷在 12 h (4 ℃) 和 3 个月 (-80 ℃) 内相对稳定。

2.8 稀释可靠性

按照“2.2.1”项下制备 2 μg·mL⁻¹ 的栀子苷甲醇溶液,以林格氏液稀释 10 倍,平行测定 5 个样品,

表3 栀子苷稳定性试验 ($n=5$)

Tab. 3 Stability test of geniposide

$C/$ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	12 h (4 °C) /%		3 months (-80 °C) /%	
	RSD	准确度 (accuracy)	RSD	准确度 (accuracy)
12	2.4	107.0	5.2	98.4
		98.9		101.0
		106.0		108.0
		110.0		101.0
		98.9		94.5
100	8.3	96.0	4.1	103.0
		101.0		99.3
		91.6		99.4
		100.0		102.0
		95.6		92.7
400	0.4	101.0	2.8	90.4
		91.6		90.7
		90.6		89.6
		95.2		95.3
		95.7		94.5

样品处理后进行测定,用质量浓度计算 RSD,结果显示在稀释 10 倍后,栀子苷的 RSD 为 4.8%,准确度分别为 91.3%、93.1%、91.4%、96.4% 和 85.0%,证明稀释 10 倍后测定的结果可靠。

2.9 脑、血液微透析探针回收率试验

微透析探针回收率一般有 2 种常用的测定方法:正透析法(增量法)和反透析法(减量法),正透析法能够反映透析针的真实回收率,反透析法则用于评价体内回收率和真实回收率的一致性。在实验过程中探针的回收率受到很多因素的影响,本实验选择灌流速度、浓度、探针使用次数等因素,考察脑、血微透析探针体内和体外回收率。

2.9.1 体内回收率稳定性考察 体内药代动力学实验一般需要持续较长的时间,这就需要同一根探针几个小时甚至几十个小时连续取样,取样过程中回收率如果变化不定,就无法得到真实可靠的实验结果。因此,对脑、血液微透析探针体内回收率的稳定性进行了考察。

脑、血液微透析探针的植入按照“2.2”项下方法进行,均以 $1.5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速灌流 $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的

微透析实验用栀子苷溶液,平衡 60 min 之后,开始收集,每 1 h 为一份样品,共收集 10 h,样品处理后进行测定,按公式 1 计算反透析法探针回收率(RL),结果见表 4。公式 1:回收率 = $(C_0 - C_{\text{dialysate}}) / C_0 \times 100\%$, $C_{\text{dialysate}}$ 为透析液浓度中栀子苷的浓度, C_0 为原液中栀子苷浓度。结果表明,脑、血微透析探针对于栀子苷的体内回收率在 10 h 内保持相对稳定,脑探针对于栀子苷的体内平均回收率为 23.4%,血液探针对于栀子苷的体内平均回收率为 42.6%。

表4 脑、血微透析探针对于栀子苷体内回收率稳定性考察

Tab. 4 Stability of brain and blood probe recovery for geniposide in vivo

时间 (time) /h	脑探针体内回收率 /% (brain probe recovery)	血液探针体内回收率 /% (blood probe recovery)
1	23.7	40.4
2	21.3	39.7
3	22.0	40.7
4	25.9	38.4
5	25.9	40.9
6	21.3	47.9
7	25.3	46.2
8	23.1	42.1
9	22.0	43.8
10	23.1	46.0

2.9.2 灌流速度对探针体外回收率的影响 分别采用正透析法和反透析法测定并计算体外回收率。正透析法:将探针置于 $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的微透析实验用栀子苷溶液中(恒温 37 °C),分别以 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速灌注林格氏液,每个流速在平衡 60 min 后,收集 5 份样品(每份 30 μL),样品处理后进行测定,并计算正透析法探针回收率(RR)(公式 2) = $C_{\text{dialysate}} / C_0 \times 100\%$,其中 $C_{\text{dialysate}}$ 为微透析液中栀子苷浓度, C_0 为原药液中栀子苷浓度。结果见图 2。

反透析法:将探针置于林格氏液中(恒温 37 °C),分别以 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速灌注 $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的微透析实验用栀子苷溶液,每个流速在平衡 60 min 后,收集 5 份样品(每份 30 μL),样品处理后进行测定,按照公式 1 计算反透析法探针回收率。结果见图 2。结果显示,在 0.5~3.0 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 范围内,随着灌流速度的增大,脑、血液微透析探针的回收率均随着流速的增大而下降;相同流速时,2 种探针的正

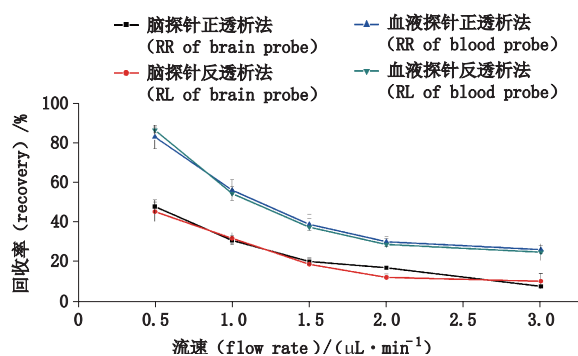


图2 灌流速度对脑、血液微透析探针体外正、反透析法回收率的影响 ($n=5$)

Fig. 2 The effect on RR and RL of brain and blood probe under different flow rate *in vitro*

透析法、反透析法测得的回收率结果基本一致。微透析探针的回收率跟透析针半透膜的表面积成正比,而血液微透析探针的半透膜长度为脑微透析探针的2.5倍,因此其回收率也要高于脑微透析探针。

2.9.3 灌流速度对探针体内回收率的影响 按照“2.3”项植入脑、血微透析探针,分别以0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速灌流200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的微透析实验用栀子苷溶液,每种流速在平衡60 min后,收集5份样品,样品处理后进行测定,公式1计算反透析法回收率。结果见图3。结果表明,在0.5~3.0 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$,随着灌流速度的增加,脑、血微透析探针对于栀子苷的体内回收率均逐渐降低。

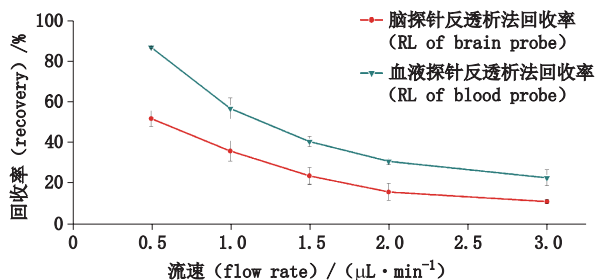


图3 灌流速度对脑、血液微透析探针体内回收率的影响 ($n=5$)

Fig. 3 The effect on recovery of brain and blood probe under different flow rate *in vivo*

2.9.4 栀子苷质量浓度对探针体外回收率的影响 在同一恒定的灌流速度下,采用正透析法浓度对探针体外回收率的影响。依次将探针置于50、200、500、1 000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的微透析实验用栀子苷溶液中(恒温37 $^{\circ}\text{C}$),以恒定的流速(1.5 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$)灌注林格氏液,每个浓度在平衡60 min后,收集5份样品(每份30 μL),质量浓度为1 000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的微透析实验用栀子苷溶液采用林格氏液稀释10倍后再进行测定,其他

原溶液及样品直接处理后进行测定。按公式2计算正透析法探针回收率,结果见图4。结果显示,当灌流速度不变时,在4种不同药物浓度的溶液中测得的脑、血液微透析探针回收率相似。以回收率对浓度做图,得到与x轴基本平行的线,表明在50~1 000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,脑、血液微透析探针的回收率与浓度无关。

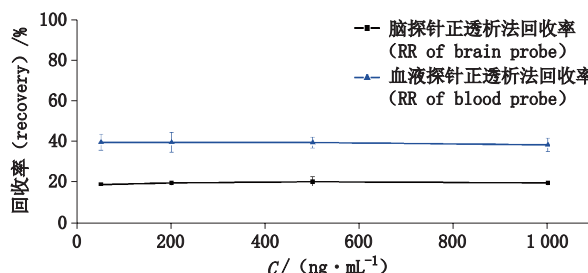


图4 浓度对脑、血液微透析探针体外回收率的影响 ($n=5$)

Fig. 4 The effect on recovery of brain and blood probe under different concentration *in vitro* ($n=5$)

2.9.5 微透析探针使用次数对体外回收率的影响 选择灌流速度为1.5 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的微透析实验用栀子苷溶液,采用正透析法分别对新探针、体内使用1次和使用2次并经过恢复处理的探针进行体外回收率试验,每个探针在平衡60 min后,收集5份样品(每份30 μL),测定峰面积并用公式2计算RR,结果见图5。

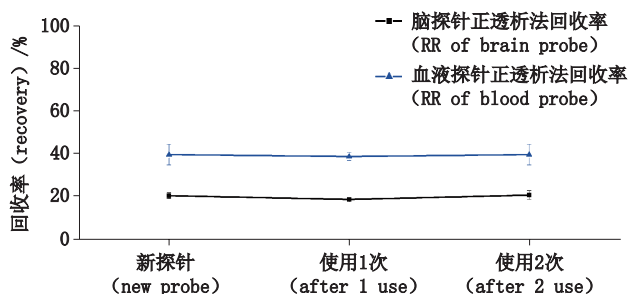


图5 使用次数对脑、血液微透析探针体外回收率的影响 ($n=5$)

Fig. 5 The effect on recovery of brain and blood probe with different times *in vitro*

结果显示,在使用1次和2次并经过恢复处理后,脑、血液探针对于栀子苷的回收率与新探针的相比,基本保持一致,说明探针的恢复处理对其继续使用并保持较高的透过率有重要的影响。

3 讨论

微透析作为一种新型生物采样技术,能够在不干扰机体正常生命过程的情况下进行在体、实时、在线取样,根据不同的组织和靶器官,选择不同类型的透析针,可以实现给药后多个部位样品的同时采集。微透析探针的回收率是微透析技术用于研究药物体内

动力学的一个关键问题,影响回收率的因素有灌流速度、温度、半透膜的性质等,因此探针回收率的研究是其用于进一步研究的首要工作。

采用微透析进行药物体内动力学研究一般需要持续长时间的采集样品,因此首先对微透析探针的体内稳定性进行了考察。通过对栀子苷脑、血探针回收率的10 h稳定性的考察,发现探针在体内的稳定性良好,能够保证长时间实验时数据的准确性。灌流速度直接决定了半透膜两侧物质交换的效率,灌流速度越快,膜两侧物质的平衡时间越短,导致回收率较低,相反,灌流速度越慢则回收率越高,但是收集的样品量也会相应减少,需要综合回收率和样品量两方面来选择灌流速度。本实验分别采用正透析法和反透析法考察了不同流速对栀子苷探针体外回收率的影响,最终选择的灌流速度为 $1.5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 30 min 收集1份样品。

通过反透析法测定探针的体内回收率,判断其与体外回收率是否一致,进而推测给药后体内药物的真实浓度。本实验采用反透析法对栀子苷探针体内回收率进行了考察,结果表明不同流速下所测得的体内回收率与体外回收率基本一致,反透析法测得的回收率能够用于推测靶器官内药物的浓度。

探针使用后,本实验先采用高流速灌流2%肝素钠溶液约30 min,以冲洗附着在探针半透膜上的生物基质,再以低流灌流超纯水约12 h冲洗盐溶液,经上述恢复处理后,使用不超过3次的探针,与新探针相比,仍然能够保持较高的透过率。

参考文献

- [1] KITANO A, SAIKA S, YAMANAKA O, *et al.* Genipin suppression of fibrogenic behaviors of the α -TN4 lens epithelial cell line[J]. J Cataract Refract Surg, 2006, 32(10): 1727
- [2] MA TT, LI XF, LI WX, *et al.* Geniposide alleviates inflammation by suppressing MCP2 in mice with carbon tetrachloride-induced acute liver injury and LPS-treated THP-1 cells[J]. Int Immunopharmacol, 2015, 29(2): 739
- [3] LIAO PP, LIU LH, WANG B, *et al.* Baicalin and geniposide attenuate atherosclerosis involving lipids regulation and immunoregulation in ApoE^{-/-} mice[J]. Eur J Pharmacol, 2014, 740: 488
- [4] WANG JM, ZHANG YY, LIU RX, *et al.* Geniposide protects against acute alcohol-induced liver injury in mice via up-regulating the expression of the main antioxidant enzymes[J]. Can J Physiol Pharm, 2015, 93(4): 261
- [5] MA TT, HUANG C, ZONG GJ, *et al.* Hepatoprotective effects of geniposide in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis[J]. J Pharm Pharmacol, 2011, 63(4): 587
- [6] YIN F, LIU JH, ZHANG XX, *et al.* Geniposide induces the expression of heme oxygenase-1 via PI3K/Nrf2-signaling to enhance the antioxidant capacity in primary hippocampal neurons[J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(11): 1841
- [7] LI FH, LI WH, LI XG, *et al.* Geniposide attenuates inflammatory response by suppressing P2Y₁₄ receptor and downstream ERK1/2 signaling pathway in oxygen and glucose deprivation-induced brain microvascular endothelial cells[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 185: 77
- [8] PAN LM, ZHOU J, ZHU HX, *et al.* Study on integrated pharmacokinetics of gardenia acid and geniposide: time-antioxidant efficacy after oral administration of Huanglian-Zhizi couplet medicine from Huang-Lian-Jie-Du-Tang in MCAO rats[J]. Am J Chin Med, 2014, 42(2): 393
- [9] ZHAO CH, ZHANG HJ, LI H, *et al.* Geniposide ameliorates cognitive deficits by attenuating the cholinergic defect and amyloidosis in middle-aged Alzheimer model mice[J]. Neuropharmacology, 2016, 116: 18
- [10] LIU WZ, LI GL, HOLSCHER C, *et al.* Neuroprotective effects of geniposide on Alzheimer's disease pathology[J]. Rev Neurosci, 2015, 26(4): 371
- [11] CHAURASIA CS. *In vivo* microdialysis sampling: theory and applications[J]. Biomed Chromatogr, 1999, 13(5): 317
- [12] 徐铭, 李范珠. 微透析取样技术及其在体内药物分析中的应用[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(7): 1030
- [12] XU M, LI FZ. Microdialysis sampling technique and its application in biopharmaceutical analysis[J]. Chin J Pharm Anal, 2006, 26(7): 1030
- [13] CHEN CF, DREW KL. Droplet-based microdialysis: Concept, theory, and design considerations[J]. J Chromatogr A, 2008, 1209(1-2): 29
- [14] STAHL L. Microdialysis in pharmacokinetics[J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 1993, 18(1): 89
- [15] 吕允凤. 应用微透析技术测定天麻素对大鼠脑内乙酰胆碱释放量的影响[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(10): 1720
- [15] LÜ YF. Effect of gastrodin on release of extracellular acetylcholine in rat brain dialysate[J]. Chin J Pharm Anal, 2013, 33(10): 1720
- [16] 李周, 王利胜, 巴文强, 等. 青藤碱、雷公藤甲素皮肤和血液在体微透析方法的建立[J]. 中草药, 2015, 46(14): 2076
- [16] LI Z, WANG SL, BA WQ, *et al.* Establishment of skin and blood microdialysis sampling method of sinomenine and triptolide *in vivo* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2015, 46(14): 2076

(本文于2017年12月9日修改回)