

微透析技术及在药学中的应用进展

韩冬¹, 班春林², 崔黎丽¹, 李国栋¹ (1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 北京军区总医院药剂科, 北京 100700)

摘要 本文介绍了微透析技术的原理和组成, 对微透析技术用于体内药物分析时的回收率测定方法的优缺点以及应用进展进行了综述, 展望了微透析技术用于药学分析领域的应用前景。

关键词 微透析; 药学; 体内药物分析; 应用

中图分类号: R917 **文献标识码**: A **文章编号**: 1006-0111(2005)03-0139-04

微透析是从神经化学领域发展起来的可以对内源性神经递质及其代谢物进行实时取样的新技术。与传统取样技术相比, 微透析技术有以下优点: ①它对取样部位的伤害很小, 几乎不影响组织中的生理过程, 得到的样品更能反映物质进入人体后的实际变化; ②微透析技术不改变组织细胞外液 (extracellular fluid, ECF) 中的液体平衡, 既可以对同一组织进行长时间连续采样, 也可以对同一动物进行多个部位采样, 因此, 用较少的实验动物就可以得到足够的数据, 避免了由于动物的个体差异所造成的实验误差; ③由于微透析技术只允许小分子物质通过半透膜, 大分子的蛋白、脂质类物质不随透析液进入检测装置, 所得样品干净, 可以直接进行样品分析, 省去了繁琐的样品前处理步骤; ④微透析技术可以直接对 ECF 中的物质分析, 与采血取样技术相比, 药物在 ECF 中的浓度与其药理或毒理作用的相关性更大。因此, 从 20 世纪 80 年代起, 微透析技术被广泛用于药学研究的各个领域^[1]。

1 微透析装置与基本原理

1.1 微透析系统的组成 微透析系统由微量注射泵、探针、灌流液、收集器及分离检测装置组成。探针是一段管式半透膜连接在石英、不锈钢或塑料管上, 探针的外径为 200 ~ 500 μm, 截留分子量在 5 000 ~ 100 000 Da, 根据不同的用途而定。为了适合在不同的组织中取样, 微透析探针可以有并联 (parallel) 和串联 (serial) 两种。并联型探针又分为同心圆式 (concentric) 和套管式 (cannula)。根据材料的不同, 可以分为刚性 (rigid) 和柔性 (flexible) 探针, 分别用于脑内和静脉物质微透析分析。串联型探针有线性 (linear) 和环形 (loop) 两种, 适用于皮肤、肌肉、肿瘤等部位取样。此外还有一种分流探针 (shunt probe) 适合于血

液和胆汁中取样。微量注射泵主要用于向探针灌流液体, 一般灌流速度在 0.1 ~ 5 μL/min, 速度要恒定。灌流液的组成、浓度应该与细胞外液接近, 一般选用各种 Ringer's 液, 这样除了检测的物质分子可以自由通过半透膜外, 其它小分子物质在半透膜两边保持平衡状态。透析液进入收集器后, 可以联用其它分离检测仪器检测, 也可以直接在线分析。

1.2 微透析技术原理 微透析技术是利用物质沿浓度梯度进行扩散和半透膜对小分子化合物具有通透性的原理设计的。当把探针埋入组织后, 由于灌流液的组成与 ECF 中组成接近, 渗透压相同, 因此水分子和其它小分子物质不会进入探针内, 与蛋白相结合的药物及其它大分子化合物由于不能通过半透膜而被排斥在探针外, 因此只有游离的小分子药物会沿浓度梯度扩散进探针, 并被灌流液带出探针。由于结合型药物分子无药理作用, 因此相对其它取样技术而言, 微透析技术所测定的 ECF 中的游离药物分子浓度与药物的效应之间相关性更强。

2 回收率的测定

在微透析实验中, 因为药物在探针内外存在浓度梯度, 所以体系处于非平衡状态, 透析液中的药物浓度只是 ECF 中的一部分。为了得到药物在 ECF 中的真实浓度, 就需要知道探针的相对回收率 (relative recovery, RR)。相对回收率是微透析实验中最重要参数, 影响相对回收率的因素包括体外因素 (温度、灌流液性质、灌流速度、半透膜性质、膜表面积、药物性质等) 和体内因素 (药物的细胞吸收、主动转运、代谢速率、蛋白结合等)。相对回收率可以进行体外校正 (in vitro calibration) 和体内校正 (in vivo calibration), 在血液或胆汁微透析实验中, 因为药物在其中扩散速度快, 不影响探针的回收率, 所以只进行体外校正即可; 而在一些实体组织中, 如脑、肝脏、肌肉等, 药物在其中的扩散比通过半透膜慢, 因此体内因素成为影响回收率的决定因素, 必须进

作者简介: 韩冬 (1975-), 男, 汉族, 硕士研究生。

Tel: 021-25071516, E-mail: handong7511@sohu.com

行体内校正。相对回收率的广义表达为:

$$RR = \frac{C_{\text{outlet}} - C_{\text{inlet}}}{C_{\text{ECF}} - C_{\text{inlet}}}$$

其中: C_{outlet} 为透析液中的药物浓度, C_{inlet} 表示灌流液中的药物浓度, C_{ECF} 细胞外液中的浓度。现将几种测量相对回收率的方法分述如下:

2.1 体外校正 体外校正实验是把探针放入已知浓度的样品溶液中, 按体内微透析方法进行, 一段时间后收集灌流液, 测定灌流液中的药物浓度 (C_{in}), 并与溶液标准浓度相比, 即得相对回收率。体外法没有考虑体内的生理因素对回收率的影响, 所以, 只有在体内因素对实验结果影响不大, 或只想知道药物在体内的变化而不要求绝对含量时, 体外校正才满足要求。

2.2 体内校正

2.2.1 极慢流速法 (use of very low flow rate) 实验表明, 相对回收率随灌流速度的增加而降低, 两者关系符合公式: $RR = 1 - e^{-k/\Phi}$ 。 Φ 表示灌流速度, RR 表示相对回收率, k 为定值。文献报道^[2], 当灌流速度小于 50 nL/min、分子量小于 500 Da 时, 相对回收率将大于 95%, 此时, 引入的回收率误差可以忽略。但是, 当灌流速度减慢时, 为了收集足够分析的样品, 取样时间被延长, 导致微透析的时间分辨性降低。

2.2.2 内标法 (internal standard) 内标法是在灌流液中加入一已知浓度的内标物, 通过体外实验求得药物和内标的回收率比, 并且假设体内实验中, 两者的回收率比不发生变化, 通过测定内标在体内的相对回收率来计算药物的回收率。内标法要求所选内标与药物的性质相近, 一般为结构类似的化合物。内标法实验简单, 省时。

2.2.3 反透析法 (retrodialysis) 由于内标与药物在体内的动力学情况不完全相同, 因此内标法仍然存在误差。反透析法则可以消除这种误差, 反透析法假设药物在半透膜两侧的渗透性一样, 当把已知量的药物加入灌流液时, 一段时间后测量透析液中的药物浓度, 相对回收率可以通过下式计算:

$$RR = \frac{C_{\text{per}} - C_{\text{dia}}}{C_{\text{per}}}$$

C_{per} 表示灌流液中的药物浓度, C_{dia} 表示透析液中的浓度。

2.2.4 外推至零流量法 (extrapolation to zero flow rate) 外推至零流量法是通过测定在不同流速下灌流液中的药物浓度, 并对结果进行非线性回归, 外推至流速为零时的浓度即为组织中的药物浓度。由于流速为零, 理论上组织中细胞外液浓度和透析液中浓度相等。

2.2.5 零净流量法 (method of zero net flux) 在零净流量法中, 配制一系列不同浓度药物的灌流液进行微透析实验, 如果细胞外液中的药物浓度大于灌流液中的浓度, 药物会沿浓度梯度进入探针, 反之, 药物会沿浓度梯度进入组织。当两者浓度相等时, 就没有药物的净扩散。这时以药物在灌流液中的浓度 (C_{in}) 为横坐标, 药物的浓度变化 ($C_{\text{in}} - C_{\text{out}}$) 为纵坐标作图, 结果应为一一直线, 与横轴的交点所对应的浓度即为组织中的浓度, 斜率为相对回收率。零净流量法因为以药物本身作对照, 所以结果更为准确, 但本法费时。

虽然减小流速或增加半透膜的面积可以提高相对回收率, 但是流速降低会使样品量减少, 为了收集足够的样品以达到检测限, 需要延长取样的时间间隔, 因此降低了微透析的时间分辨性 (temporal resolution), 增加半透膜的面积可以提高相对回收率, 所以可以提高时间分辨性, 但必须保证探针周围的组织均匀, 否则会降低微透析的空间分辨性 (spatial resolution)。因此微透析实验中必须综合考虑回收率、半透膜大小等因素, 以得到最优结果。

3 分析方法

微透析技术的时间分辨性取决于分析方法的灵敏度和半透膜的面积, 在微透析实验中, 一般灌流速度控制在 1 ~ 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, 如果每 5 min 收集一次样品, 每次取样量为 5 ~ 25 μL , 可以满足高效液相的分析要求。同时, 质谱、紫外、电化学等检测手段可使检测灵敏度达到 μg 和 ng 水平。这些技术都极大地推动了微透析技术在药代动力学中的应用。根据分离检测手段的不同, 微透析实验又可以分为基于非分离和基于分离的微透析方法。

3.1 基于非分离的微透析方法 (non-separation based approaches) 基于非分离的方法主要有生物传感器法^[3,4]、免疫法^[5]和质谱法^[6]。生物传感器主要部分是酶电极, 可以特异地与透析液中的待测物反应, 并被检测器检测。生物传感器联用微透析技术已经成功用于一些内源性物质的研究。微透析装置联用谷氨酸传感器和荧光检测器, 持续在线检测谷氨酸在清醒的猴脑内的浓度变化的方法已经被报道^[3], 体外实验表明, 谷氨酸检测限可以达到 0.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。此外, 乳酸传感器和微透析技术联用也被用于监测人体内的乳酸水平^[4]。

3.2 基于分离的微透析方法 (separation based approaches) 基于分离的微透析方法主要有高效液相色谱法 (HPLC) 和毛细管电泳法 (CE)。微透析样品属于亲水性物质的离子性溶液, 因此, HPLC 中的反

相液相色谱和离子交换色谱以及 CE 中的毛细管区带电泳和胶束电泳适合样品的直接分析。与传统的 HPLC 相比, CE 所需样品少,灵敏度高,分析时间短,所以适合与微透析联用在线检测药物在体内的动力学变化。与非分离的微透析方法相比,基于分离的微透析方法一般可以同时测定多个化合物。这在研究药物在体内的代谢变化需同时检测药物和代谢产物时十分有用。

基于分离的微透析方法中检测方法很重要,因为微透析的时间分辨性取决于检测器的灵敏度,一般来说,根据检测物质的不同,紫外、荧光、电化学检测和质谱法是 HPLC 常用的检测方法。而 CE 常用电化学检测器和激光诱导荧光法检测。如利用微透析技术和 HPLC 联用,苯丁胺(phentermine),芬氟拉明(fenfluramine)和去乙芬氟拉明(nonfenfluramine)^[7]在大鼠脑和血中的浓度可以同时检测,经过 4-(4,5-二苯基-1H 咪唑-2-基)苯甲酰氯酸盐衍生化和荧光器检测,三种物质的检测限可以达到 23pmol,线性范围分别为苯丁胺 5~2000nmol,芬氟拉明和去乙芬氟拉明 10~2000nmol,日内和日间精密度小于 10%。Sauvnet V 等^[8]报道了用微透析技术、毛细管胶束色谱技术联用激光诱导荧光检测器分析检测 γ -氨基丁酸、谷氨酸、天门冬氨酸在猴脑内的浓度,在这个方法中,分离三种物质只需 10min,检测限分别为 3,15 和 5nmol/L。

4 微透析方法的应用

4.1 在肿瘤组织中的应用 抗癌药物的疗效与肿瘤中的药物浓度关系密切。先前因为药物在肿瘤中的浓度很难直接测得,所以常用血药浓度来预测和评价药物的抗癌效果,但是在多数情况下,肿瘤组织的特殊生理情况使肿瘤中的药物浓度与血药浓度并不一致,用血药浓度来预测药物疗效并不合适。微透析技术由于可以用于肿瘤组织取样,因此对于设计抗癌药物给药方案,研究抗癌药物在肿瘤中的代谢有很大优势。Dukic S^[9]等用微透析技术研究了兔移植 VX2 瘤后的肿瘤和肌肉中甲氨蝶呤的浓度。当把探针插入肿瘤和肌肉组织后,静脉注射 30mg/kg 甲氨蝶呤,同时收集血样和透析液样品,用荧光偏振免疫和超滤法分别检测甲氨蝶呤在透析液及血中游离和总的浓度。结果肿瘤和肌肉组织中甲氨蝶呤的生物利用度(AUC)分别是血中生物利用度的(23.9±15.9)%和(14.2±8.8)%,从时间曲线来看,肌肉中甲氨蝶呤浓度与血药浓度呈正相关($r=0.97$),而肿瘤中的药物浓度与血中游离药物浓度相关性差($r=0.564$)。

4.2 微透析在血药浓度测定中的研究 与取血采样相比,微透析技术不影响动物体内的生理过程,透析液样品只与血中游离药物浓度有关。因此,可用于长效药物的血药浓度监测,配合采血取样技术,还可以进行药物蛋白结合率的研究。Yang H^[10]用一同心圆式探针检测了氟康唑及其类似物 UK-54,373 在大鼠下腔静脉的浓度,同时与股动脉采血取样比较,结果两者的 T_{1/2}, CL 和 AUC 无显著性差异(t -test, $P > 0.05$)。厄贝沙坦^[11](irbesartan)的血浆蛋白结合率很高,Hocht C 等在大鼠静脉注射厄贝沙坦后,分别取血和用探针在颈动脉取样,每 15min 收集一次样品,用 HPLC 测定血液和透析液中的浓度,两者相比测定厄贝沙坦的蛋白结合率,用蛋白结合率进行校正后的微透析样品浓度所计算得出的清除率(CL)、分布容积(V_d)和 AUC 与传统方法比较没有显著差异。

4.3 在组织中的应用 微透析技术最初用于脑内神经递质的研究,随着不同类型的探针和检测手段的进步,微透析逐渐用于肌肉、皮肤、肝脏、肾脏、眼和胆汁等组织的药物代谢和动力学研究中。此外,由于微透析技术对动物的伤害很小,因此可以在单个动物体内同时进行多个组织的研究,减少了动物个体差异对实验的影响。Tsai P 等^[12]用 HPLC 和探针同时检测黄连素在血液、肝脏和胆汁中的浓度,检测限大于 10ng/mL,线性和精密度都很好,并且证明了黄连素是经过肝脏和胆汁代谢和排泄。

5 结语

与传统的取样技术相比,微透析对动物的伤害小,可以直接检测分析药物在体内的浓度,单个动物获得的信息量大,减少了动物个体差异对实验的误差。这些优点使微透析在药物体内研究中具有广阔的前景。同时,微透析也有自身的缺陷,如微透析对脂溶性药物和蛋白结合率很高的药物提取率低,以及药物与半透膜黏附的问题等,这些问题都有待于继续研究。

参考文献:

- [1] Elmquist WF, Sawchuk RJ. Application of microdialysis in pharmacokinetics studies [J]. Pharm Res, 1997,14(3):267.
- [2] Malonne I, Davies. A review of microdialysis sampling for pharmacokinetic application [J]. Analytica Chimica Acta, 1999, 379:227.
- [3] Zilkha E, Obrenovitch TP, Koshy A, et al. Extracellular glutamate: on-line monitoring using microdialysis coupled to enzyme-amperometric analysis [J]. Neurosci. Methods 1995,60:1.
- [4] Volpe G, Moscone D, Compagnone D, et al. In vivo continuous

- monitoring of L-lactate coupling subcutaneous microdialysis and an electrochemical biocell [J]. *Sensors Actuators B*, 1995, 24 - 25; 138.
- [5] Lindefors N, Brodin E, Ungerstedt U, *et al.* Microdialysis combined with a sensitive radioimmunoassay. A technique for studying in vivo release of neuropeptides [J]. *J Pharmacol. Methods*. 1987, 17; 305.
- [6] Jacobsson I, Sandberg M, Hamberger A, *et al.* Mass transfer in brain dialysis devices—a new method for the estimation of extracellular amino acid concentration [J]. *Journal of Neuroscience Methods*. 1985, 15; 263.
- [7] Prokai L, Kim HS, Zharikova A, *et al.* Electrospray ionization mass spectrometric and liquid chromatographic – mass spectrometric studies on the metabolism of synthetic dynorphin A peptides in brain tissue in vitro and in vivo [J]. *J Chromatogr A*, 1998, 800; 59.
- [8] Sauvinet V, Parrot S, Beuturia N, *et al.* In vivo simultaneous monitoring of gamma-aminobutyric acid, glutamate, and L-aspartate using brain microdialysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: Analytical developments and in vitro/in vivo validations [J]. *Electrophoresis*. 2003, 24 (18); 3187.
- [9] Dukic SF, Kaltenbach ML, Heurtaux T, *et al.* Influence of C6 and CNS1 brain tumors on methotrexate pharmacokinetics in plasma and brain tissue [J]. *J Neurooncol*. 2004, 67(1-2); 131.
- [10] Yang H, Wang Q, Elmquist WF, *et al.* The design and validation of a novel intravenous microdialysis probe: application to flucanazole pharmacokinetics in the freely-moving rat model [J]. *Pharm Res*. 1997, 14(10); 1455.
- [11] Hocht C, Opezzo JA, Taira CA, *et al.* Hypothalamic Antihypertensive Effect of Irbesartan in Chronic Aortic Coarctated Rats [J]. *Pharmacology*. 2004, 73(3); 146.
- [12] Tsai P, Tsai TH. Simultaneous determination of berberine in rat blood, liver and bile using microdialysis coupled to high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*. 2002, 961 (1); 125.

收稿日期: 2005-01-04

胃内滞留漂浮型缓释片的研究概况

李莉华¹, 李水林¹, 王艳萍², 王卫东², 谢华通², 严晓鹏² (1. 延大医学院, 吉林 延吉 133000; 2. 中国人民解放军第 208 医院, 吉林 长春 130062)

摘要 目的: 阐述胃内滞留漂浮缓释片的研究概况。方法: 结合文献和资料, 简述胃内滞留片的释药原理, 影响漂浮性能的因素以及漂浮性能控制。结果与结论: 胃内漂浮制剂可以显著延长胃内滞留时间, 并能提高生物利用度。已经引起了国内外学者越来越多的关注, 成为药剂学研究的热点之一。

关键词 胃内滞留漂浮型; 缓释片; 释药原理; 漂浮性能

中图分类号: R944.4 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2005)03-0142-04

胃内滞留漂浮型缓释片是一类能滞留于胃液中, 延长药物的释放时间, 改善药物吸收, 利于提高生物利用度的片剂。口服给药药物主要在小肠上部被吸收。因此, 药物应设计成可以于小肠上部大量吸收的处方。药物从溶液状态到达小肠上部量越大, 吸收就越多, 停留时间越长, 则吸收时间也越长。目前多数口服控释或缓释片剂在其吸收部位的滞留时间仅 2~3h, 而制成胃内漂浮片后可在胃内滞留时间长达 5~6h, 使药物以最大量溶液状态到达吸收部位, 可延缓释放并增加吸收^[1]。

1 释药原理及特性

Tossounian 和 Sheth 最早对胃内漂浮型制剂进行了详细的描述, 并称之为“生物有效制剂”^[2, 3]。

根据流体动力学平衡体系 (hydrodynamically balanced systems, HBS) 原理设计的胃内漂浮制剂 [gastric floating (buoyant) preparation] 是由药物、一种或多种亲水凝胶滞留材料辅以其他材料制成的, 不管是以胶囊、片剂或其他形式存在, 该制剂口服后遇胃液外层凝胶膨胀, 在制剂表面形成一层凝胶屏障, 维持骨架的比重小于胃内容物 (1.004~1.01), 而漂浮于胃液上, 使其不受胃排空的影响, 并成为长时间驻留于胃的药物贮库, 药物以凝胶骨架中缓慢向胃液中迁移 (扩散或溶蚀释放), 直到所负载的药物释放完全。该剂型能使尽可能多的药物以溶解状态到达吸收部位, 因而提高了生物利用度并延缓了作用时间。制剂长时间驻留于胃中, 对直接于胃中发挥作用的药物延缓了作用时间。

理想的胃内滞留片需具有如下特性^[4]: ①在体温状态下, 片剂接触胃液后, 表面能水化形成凝胶屏障, 并膨胀保持原有片剂形状; ②片剂的组成利于片

作者简介: 李莉华 (1979-), 硕士研究生. Tel: (0431) 6505553. E-mail: lilihua1979@hotmail.com.