

血液微渗析技术研究酮洛芬在大鼠体内的药代动力学

何海冰, 唐 星*, 崔福德

(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 考察酮洛芬微渗析体内外回收率及影响因素, 研究酮洛芬静脉给药后非结合型药物在大鼠体内的药代动力学。方法 大鼠颈静脉插入探针后, 依次用不同浓度的灌注液对探针进行灌注, 测定酮洛芬体内回收率及非结合型酮洛芬在大鼠体内的药代动力学。以高效液相色谱法测定微渗析液中药物浓度。体外回收率的测定采用浓差法。结果 增量法及减量法测定的回收率一致。以浓差法测定的体外回收率为 28.75%; 反渗析法测定体内回收率为 $(40.3 \pm 2.7)\%$ 。酮洛芬静脉给药后非结合型药物的 $T_{1/2}$, AUC 和 CL 分别为 (181 ± 16) min, $(112 \pm 27) \mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $(0.22 \pm 0.05) \text{min}^{-1}$ 。结论 血液微渗析技术可用于研究非结合型酮洛芬在大鼠体内的药代动力学。

关键词: 微渗析; 酮洛芬; 药代动力学; 高效液相色谱法

中图分类号: R969.11 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2006)05 - 0452 - 05

Pharmacokinetic study of ketoprofen in rat by blood microdialysis technique

HE Hai-bing, TANG Xing*, CUI Fu-de

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: **Aim** To investigate the *in vitro* recovery and influencing factors of ketoprofen in microdialysis probe, and study the pharmacokinetic of unbound ketoprofen in rat after iv administration. **Methods** The recovery of ketoprofen was detected by a concentration difference method. After microdialysis probe was inserted into the jugular vein of male Wistar rats, the probe was infused with various concentrations perfusate. The *in vivo* recovery and the pharmacokinetics of unbound ketoprofen in rat were investigated. Dialysate samples were determined by HPLC. **Results** The recovery detected by gain was as the same as that by loss; the recovery was independent of the drug concentration surrounding the probe. The *in vitro* recovery was 28.75% by concentration difference method and the *in vivo* recovery was $(40.3 \pm 2.7)\%$ by retrodialysis method. After iv administration of ketoprofen in rat, $T_{1/2}$, AUC and CL of unbound ketoprofen were (181 ± 16) min, $(112 \pm 27) \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(0.22 \pm 0.05) \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, respectively. **Conclusion** Microdialysis sampling can be used for the pharmacokinetic study of unbound ketoprofen in rat.

Key words: microdialysis; ketoprofen; pharmacokinetics; HPLC

微渗析技术 (microdialysis) 是用于测定组织细胞外液中游离药物的一种连续、实时、在体的取样技术^[1,2]。微渗析取样是运用渗析原理的取样技术。渗析膜内外存在浓度梯度, 通常情况下, 膜外样品浓度高于膜内浓度, 可透过膜的小分子物质就可通过

扩散进入渗析管内, 并被微渗析管内连续流动的灌注液不断带出, 从而达到从活体组织中取样的目的^[3]。由于微渗析取样技术能够收集不含蛋白质的样品, 并能长期持续地从静脉中取样而无体液损失故被广泛用于直接测定血浆中游离药物浓度^[4]及用于在体测定药物的血浆蛋白结合率^[5]。

酮洛芬 (ketoprofen, KP) 是一种良好的非甾体抗炎药物, 有解热、镇痛和抗炎作用, 主要治疗关节强

直性脊柱炎、风湿性关节炎及骨关节炎。国外除广泛用于上述疾病外,还用于术后止痛、牙科疼痛、急性内脏痛和慢性癌痛等。为了更好地研究静脉注射缓释制剂的体内药代动力学,本研究以酮洛芬作为模型药物,考察了其体外、体内回收率及影响回收率的因素,并采用微渗析法测定了静脉注射酮洛芬后游离药物在大鼠体内的药代动力学。

材料与方 法

材料与仪器 高效液相色谱仪:PU-1580泵、UV-1575UV-VIS检测器(日本分光公司);色谱柱:HiQ sil C₁₈ V柱,5 μm,4.6 mm × 250 mm (KYATECH Corporation);微渗析系统:S200型微量注射泵(美国KD Scientific公司);微渗析针管(1 mL,Hamilton);自制微渗析U型探针,透析膜(DM-22,日本EICOM公司,截留相对分子质量5 000)长20 mm,探针的有效透析长度为10 mm;灌注液:抗凝葡萄糖溶液[anticoagulant dextrose (ACD) solution:柠檬酸3.5 mmol;柠檬酸钠7.5 mmol;葡萄糖13.6 mmol]^[31],临用前配制;酮洛芬(湖北武穴市迅达药业有限公司,批号040504,含量99.74%);其他药品和试剂均为色谱纯或分析纯。

样品分析方法 微渗析液样品中酮洛芬的浓度采用高效液相色谱法测定。流动相:乙腈-0.01%磷酸(55:45);检测波长为260 nm;流速为1.0 mL·min⁻¹;柱温为室温。进样量为20 μL。

流速对回收率的影响

增量法测定流速对回收率的影响 将微渗析探针的“有效透析窗”(active dialysis window)完全浸没在含有酮洛芬(500 ng·mL⁻¹, C_m)的ACD溶液中,在持续搅拌下,利用不含药的ACD溶液在不同流速(2,3,4,5和6 μL·min⁻¹)下灌注探针。在每一种流速下均收集4次微渗析液样品(每次80 μL),利用HPLC法测定渗析液中酮洛芬的浓度(C_{out})及介质中酮洛芬的浓度(C_m)。通过增量法计算酮洛芬的回收率:RG% = C_{out}/C_m × 100%。

减量法测定流速对回收率的影响 将微渗析探针浸入不含药的空白ACD溶液中,利用含有酮洛芬(500 ng·mL⁻¹, C_m)的ACD溶液灌注探针。流速以及收集样品的次数与增量法相同。按下述公式计算减量法测定的酮洛芬回收率:RL% = (C_m - C_{out})/C_m × 100%。

浓度对回收率的影响 将微渗析探针依次浸入到酮洛芬药物浓度分别为50,100,200,500,750和

1 000 ng·mL⁻¹的ACD溶液中,用空白ACD溶液以4 μL·min⁻¹的流速灌注探针。每种浓度下收集4个微渗析液样品(每次80 μL)。测定微渗析液及介质中的酮洛芬浓度,按增量回收率计算法计算酮洛芬的回收率。

回收率的日内重复性 通过连续改变探针外部的介质浓度并测定其回收率的变化情况来考察探针回收率的重复性。介质为含有酮洛芬的ACD溶液,其浓度从0~1 000 ng·mL⁻¹,共6个浓度点。探针的灌注液为不含药的ACD溶液,灌注速度为4 μL·min⁻¹。每隔20 min收集一次渗析液,同时改变介质中酮洛芬的浓度,浓度的改变方法是从低浓度到高浓度,然后返回最低浓度,共收集3个循环。增量回收率计算法计算酮洛芬的回收率。

浓差法测定探针的回收率 将微渗析探针浸入含有酮洛芬(500 ng·mL⁻¹)的ACD溶液中,然后利用含有不同浓度酮洛芬的ACD溶液(50,100,200,500,750,1 000 ng·mL⁻¹, C_{perfusate})以4 μL·min⁻¹流速进行灌注。收集各个灌注液浓度下的微渗析液样品,每个浓度收集5次,测定渗析液中的药物浓度(C_{dialysis})。更换灌注液后,至少开泵冲洗30 min后开始收集下一个样品。以微渗析液样品与灌注液之间的浓度差(C_{dialysis} - C_{perfusate})对灌注液浓度(C_{perfusate})作图。线性回归直线的斜率即为回收率,直线与横坐标上的交点即为探针外部介质中的药物浓度。

体内微渗析试验

探针的植入 雄性Wistar大鼠(230~270 g),腹腔注射乌拉坦(1.2 g·kg⁻¹)麻醉后,固定于鼠板上。将微渗析探针植入大鼠左侧颈静脉约2 cm。大鼠周围环境的温度控制在37~39 ℃。

反向渗析法测定探针的体内回收率 微渗析探针植入大鼠颈静脉后,用ACD溶液做为灌注液,冲洗探针60 min。冲洗期过后,依次用浓度为100,500或1 000 ng·mL⁻¹的酮洛芬ACD溶液(C_{perfusate})为灌注液,以4 μL·min⁻¹流速进行灌注。收集各个灌注液浓度下的微渗析液样品,每个浓度收集5次,测定渗析液中的药物浓度(C_{dialysis})。更换灌注液后,至少开泵冲洗30 min才开始收集下一个样品。体内回收率按下述公式计算:R_{in vivo} = 1 - C_{dialysis}/C_{perfusate}

酮洛芬在大鼠体内的药代动力学研究 微渗析探针植入大鼠左侧颈静脉后,首先以ACD溶液做为灌注液,冲洗探针60 min后,大鼠股静脉给予酮洛

芬溶液剂 $24 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。给药后立即开始收集渗析液,每 20 min 采集一次,采集时间为 8 h。

血药浓度数据采用非隔室模型,使用 Excel 进行处理。

结果

1 酮洛芬典型色谱图

在该条件下酮洛芬的最低检测浓度为 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,最低定量浓度为 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,出峰时间约为 6.6 min,色谱图见图 1,可见微渗析灌注液对酮洛芬的分离测定无干扰。浓度在 $50 \sim 2000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,酮洛芬的峰面积与浓度呈线性,回归方程为 $A = 15.0821C + 65.4587$, $r = 0.9988$ ($n = 7$)。

2 微渗析探针的体内外回收率

微渗析探针的体内外回收率的结果均以分别测定 3 个探针所得的平均值表示。

通过增量法及减量法进行的酮洛芬微渗析探针回收率的测定结果表明,探针的回收率随着流速的增加而降低,且两种方法下得到的探针回收率在各流速下均保持一致,说明酮洛芬的回收率和传递率相同^[6],结果见图 2。综合考虑探针的回收率和单位时间内收集样品的体积,选择 $4 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 做为灌注流速,取样时间间隔为 20 min。

浓度对回收率的影响的测定结果表明,当以 $4 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 为灌注速度时,在 6 个介质浓度下,酮洛芬的回收率为 $(29.8 \pm 1.6)\%$,见图 3。可见,在所选浓度范围内 ($50 \sim 1000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$),探针的回收率基本保持一致。回收率的日内重复性结果如图 4 所示。结果显示,在 3 个循环中,酮洛芬在探针中的回收率的变化基本保持稳定,为 $(28.7 \pm 2.2)\%$ 。

浓差法测定探针回收率的结果表明,以渗析液和灌注液中酮洛芬浓度差对灌注液中酮洛芬的浓度

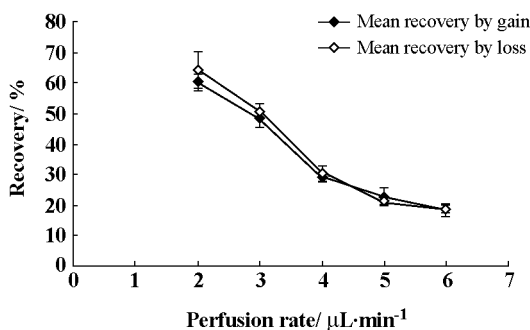


Figure 2 Dependence of recovery on perfusion rate ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

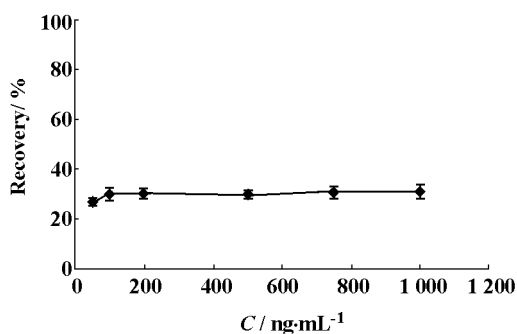


Figure 3 Plots of recovery as a function of ketoprofen concentration in the solution surrounding the probe ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

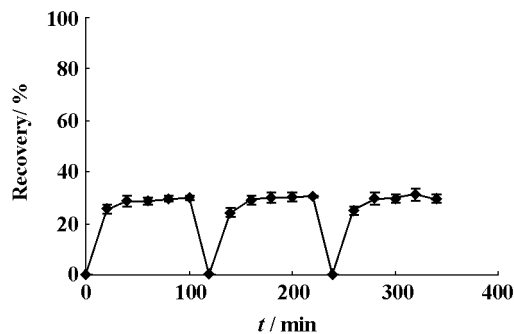


Figure 4 Intra-day reproducibility of *in vitro* recovery ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

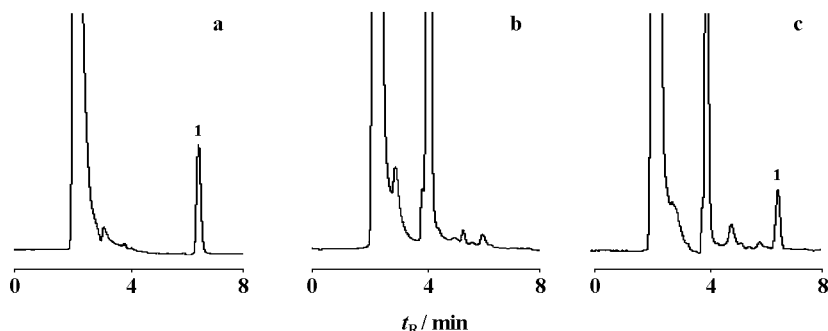


Figure 1 Typical chromatograms of (a) standard ketoprofen, (b) blank blood dialysate from the microdialysis probe before drug administration, and (c) blood dialysate sample collected from rat blood after iv administration of ketoprofen ($24 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). 1: Ketoprofen

作图,见图 5。所得直线为 $C_{\text{dialysis}} - C_{\text{perfusate}} = -0.2875C_{\text{perfusate}} + 146$ ($r=0.9979$)。直线与横轴交点处的浓度 ($507.83 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)即为探针周围溶液中酮洛芬的浓度,与介质中实际加入的药物浓度 ($500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)基本一致。直线的斜率为探针的回收率 28.75%。

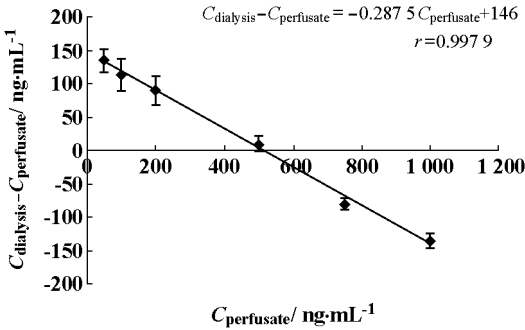


Figure 5 Concentration difference method for estimating *in vitro* recovery of ketoprofen from the microdialysis probe ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

反渗透法测定体内回收率的结果显示,在 3 个灌注浓度 ($100, 500$ 和 $1000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 下的酮洛芬体内回收率分别为 (37.1 ± 2.9)%, (42 ± 4)% 和 (41.6 ± 2.0)%, 体内平均回收率为 (40.3 ± 2.7)%。

3 大鼠体内药代动力学

大鼠静脉注射酮洛芬溶液后的血中非结合型酮洛芬浓度-时间曲线见图 6。各主要药代动力学参数如表 1 所示。大鼠血中非结合型酮洛芬的药物浓度 C_u 用渗析液中酮洛芬的浓度 (C_{dialysis}) 通过下述公式^[7]计算: $C_u = C_{\text{dialysis}} / R_{\text{in vitro}}$ 。

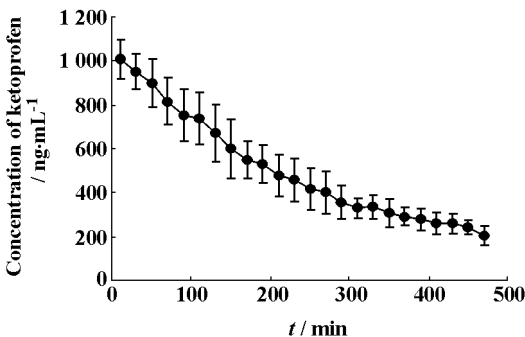


Figure 6 Mean protein-unbound blood concentration-time profile of ketoprofen after iv administration $24 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of ketoprofen solution in rats ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

讨论

本研究将微渗析技术应用到酮洛芬体内非结合型药物的药代动力学的研究中,通过体内外的回收

Table 1 Pharmacokinetic parameters of ketoprofen in rat blood measured by microdialysis following single iv administration of $24 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ketoprofen solution ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Parameter	Solution
K_e / min^{-1}	0.0039 ± 0.0003
$T_{1/2} / \text{min}$	181 ± 16
$\text{AUC} / \mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{mL}^{-1}$	112 ± 27
$\text{CL} / \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$	0.22 ± 0.05
$V_{ss} / \text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.13 ± 0.06

率测定,探讨了应用微渗析技术结合高效液相色谱法测定渗析介质中酮洛芬浓度的可能性,为下一步监测酮洛芬静脉注射缓释制剂在体内的药代动力学研究提供依据。采用浓差法测定了探针的体外回收率,并考察了探针周围溶液浓度和灌流速度对探针回收率的影响。影响探针回收率的参数主要有温度、灌流液流速、透析膜的化学和物理性质、探针的几何形状、膜表面积、待测化合物的理化性质及其在基质中的扩散速度等^[8]。实验结果显示,探针周围溶液浓度对探针的回收率无影响;探针回收率随着灌流速度的增加而降低^[2]。在低流速下,探针渗析膜内外溶液的扩散接近平衡,因此相对回收率较高;但在低流速下,在单位时间内收集到的渗析样品体积较小。随着灌流速度的增加,探针渗析膜两侧的扩散远远达不到平衡,回收率下降,但单位时间内收集的样品体积却增大了。一般情况下,样品中药物浓度越高越有利于 HPLC 检测,但是单位时间内必须收集到足够量的样品来供 HPLC 进样,且取样时间间隔不宜过长,否则难以真实的检测体内药物水平变化的情况。

由于纳米制剂与普通制剂在药代动力学的检测方面存在一定的差异,主要为:与普通制剂相比,纳米制剂组的生物样品中不仅包含有已释放出来的药物,还包含有仍然滞留在制剂内部的药物,而后者很难被分离出来。尽管在提取时可选择不溶解载体的溶媒,尽量减少未释放药物被萃取出来的几率,但由于纳米制剂载体的比表面积较大,很难避免药物被萃取出来。因此,依靠现有的样品处理与分析手段,只能测定生物样品中的药物的总浓度。目前,微渗析技术应用的领域有神经学、实验药理学、药代动力学、药物代谢研究等^[2]。由于微渗析技术能够获得不含蛋白质等生物大分子的样品,可以测定游离药物的浓度,因此在监测纳米制剂,如乳剂、脂质体和固体脂质纳米粒等,经静脉给药后药物在体内药代

动力学研究中具有广阔的应用前景。

References

- [1] Verbeek RK. Blood microdialysis in pharmacokinetic and drug metabolism studies [J]. Adv Drug Del Rev, 2000, 45: 217 - 228.
- [2] Ding PT, Wu H, Zheng JM. Application of microdialysis in pharmacokinetic and drug metabolism studies [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2002, 37: 316 - 320.
- [3] de Lange EC, de Boer BA, Bræmer DD. Microdialysis for pharmacokinetic analysis of drug transport to the brain [J]. Adv Drug Del Rev, 1999, 36: 211 - 227.
- [4] Lin LC, Hung LC, Tsai TH. Determination of (-)-epigallocatechin gallate in rat blood by microdialysis coupled with liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2004, 1032: 125 - 128.
- [5] Evrard PA, Cumps J, Verbeeck RK. Concentration-dependent plasma protein binding of flurbiprofen in the rat: an *in vivo* microdialysis study [J]. Pharm Res, 1996, 13: 18 - 22.
- [6] Ding PT, Xu Hui, Bian SJ, et al. Transdermal delivery study of ondansetron by cutaneous microdialysis in rat [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2000, 35: 305 - 308.
- [7] Evrard PA, Deridder G, Verbeeck RK. Intravenous microdialysis in the mouse and the rat: development and pharmacokinetic application of a new probe [J]. Pharm Res, 1996, 13: 12 - 17.
- [8] Chaurasia CS. *In vivo* microdialysis sampling: theory and applications [J]. Biomed Chromatogr, 1999, 13: 317 - 332.

2006年全国药物质量分析学术研讨会

——《药物分析杂志》第二届普析通用杯征文通知(第二轮)

随着现代科学技术在药学领域的广泛应用和对药品质量要求的不断提高,药物质量研究已经越来越引起人们的重视,并取得令人瞩目的成绩。在中国药学会支持下,中国药学会药物分析专业委员会、《药物分析杂志》编辑部和普析通用仪器有限责任公司定于2006年9月下旬在四川省成都市,举办《药物分析杂志》第二届普析通用杯全国药物质量分析学术研讨会。本届会议将由药物分析专家组成评委会,评选出一等奖2名,二等奖4名,三等奖8名,评选范围包括近期来稿及本次征文。本次会议评选出的优秀论文将获得学分,并在本刊优先发表。现将有关征文事宜通知如下:

一、征文内容

①液相-质谱、气相-质谱联用、薄层色谱、毛细管电泳等色谱分析在化药、中药、抗生物质控中的应用;②近红外、热分析、X射线粉末衍射法在药物多晶中的应用;③药物体内代谢研究;④生化药物、蛋白质、肽类药物、基因工程药物分析、药物放射性免疫分析;⑤药物原料、制剂及新剂型的研究、药用辅料及药包材质量分析;⑥残留溶剂、残留农药及重金属在药品中的检测;⑦药物、毒物快速检验,食品、保健品中非法添加药物的检测技术;⑧其他。

二、撰稿要求

①论文应是未公开发表的、已投药物分析杂志的文章,尚未刊出的稿件也可参评(但需另付评审费)。综述一般不超过5000字,研究论文一般不超过3000字。论文体例、格式请参见本刊2006年第1期稿约。

②每篇稿件需附单位介绍信及200元稿件评审费(不交评审费,不能参评)。

③征文截止日期:2006年6月30日

三、投稿方式及联系人

评审费邮寄:100050,北京天坛西里2号 中国药品生物制品检定所药物分析杂志编辑部

投稿请发电子邮件: ywfx@nicpbp.org.cn 或 ywfxzz@126.com

来稿请注明“会议征文”字样,以区别于其他投稿,并注明联系电话,谢谢合作!

电话: 86-10-67058427, 67095201; 传真: 86-10-67012819; 联系人: 刘小帅