

# 微渗析结合 RP-HPLC 研究盐酸平阳霉素在家兔血中的药代动力学

史 健<sup>1</sup>, 高子彬<sup>2</sup>, 魏 静<sup>2</sup>, 丁平田<sup>2\*</sup>, 陈大为<sup>2</sup>

(1. 河北医科大学 第四医院, 河北 石家庄 050011; 2. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要:** 采用微渗析技术研究盐酸平阳霉素在体药代动力学, 用 Supelco RP-amide C<sub>16</sub> 柱进行样品的 HPLC 分析, 盐酸平阳霉素的血药浓度用 3P87 程序处理。结果表明, 家兔静注盐酸平阳霉素后, 渗析液中的药物浓度在 1.04 ~ 66.56 μg·mL<sup>-1</sup> 时, 浓度与峰面积有良好的线性关系 ( $r^2 = 0.9994$ )。微渗析探针的在体回收率为 (42.8 ± 3.4)% ( $n = 6$ )。所测血药浓度经 3P87 程序拟合后, 药-时曲线符合二室模型,  $T_{1/2\alpha}$  及  $T_{1/2\beta}$  分别为 14.9 及 60.3 min。因此, 该方法可用于盐酸平阳霉素药代动力学研究。

**关键词:** 盐酸平阳霉素; 微渗析; 反相高效液相色谱法; 血药浓度

中图分类号: R969.11 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2007)03-0297-04

## Pharmacokinetics of pingyangmycin hydrochloride in rabbits determined by microdialysis coupled with RP-HPLC

SHI Jian<sup>1</sup>, GAO Zi-bin<sup>2</sup>, WEI Jing<sup>2</sup>, DING Ping-tian<sup>2\*</sup>, CHEN Da-wei<sup>2</sup>

(1. The Forth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China;

2. Department of Pharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**Abstract:** Microdialysis coupled with RP-HPLC was used to study the blood pharmacokinetics of pingyangmycin hydrochloride in rabbits. Supelco RP-amide C<sub>16</sub> column was adopted for the analysis of pingyangmycin hydrochloride. The data was analyzed with 3P87 program. The calibration curve was linear in the concentration range from 1.04 to 66.56 μg·mL<sup>-1</sup> ( $r^2 = 0.9994$ ). The *in vivo* recovery of microdialysis probe was (42.8 ± 3.4)% ( $n = 4$ ). The concentration-time curve of pingyangmycin hydrochloride was fitted to two-compartment model.  $T_{1/2\alpha}$  and  $T_{1/2\beta}$  were 14.9 and 60.3 min, respectively. The method is proved to be accurate, simple and suitable for the pharmacokinetics study of pingyangmycin hydrochloride in rabbits.

**Key words:** pingyangmycin hydrochloride; microdialysis; RP-HPLC; blood drug concentration

微透析技术 (microdialysis) 兴起于 20 世纪 80 年代中期, 已在神经化学、生物行为学、药理学及药物代谢动力学等领域的研究中发挥了独特的作用。与传统的取样技术相比, 微渗析在体取样技术具有其独特的优势<sup>[1]</sup>。

盐酸平阳霉素 (pingyangmycin hydrochloride, PYM) 是博莱霉素的单一组分 A<sub>5</sub><sup>[2]</sup>, 其结构式见图 1。其抗癌机制是使细胞 DNA 单链断裂, 降低 DNA

溶解度, 抑制细胞有丝分裂, 并与 DNA 结合使之破坏<sup>[3]</sup>。目前, PYM 已广泛应用于头颈部恶性肿瘤的治疗, 效果较好。目前报道的血中盐酸平阳霉素的测定均是在各时间点常规采血, 采用生物测定剂量法进行检测<sup>[4]</sup>。本实验采用微渗析技术结合 RP-HPLC 测定法, 分析以游离型存在的盐酸平阳霉素的血药浓度, 具有取样量少、操作简便、准确可靠等优点。目前国内尚未见相同报道。

### 材料和方法

仪器 高效液相色谱系统 (配有可变波长紫外

收稿日期: 2006-06-12.

\* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 24 - 23986305,

E-mail: dingpingtian@yahoo.com.cn

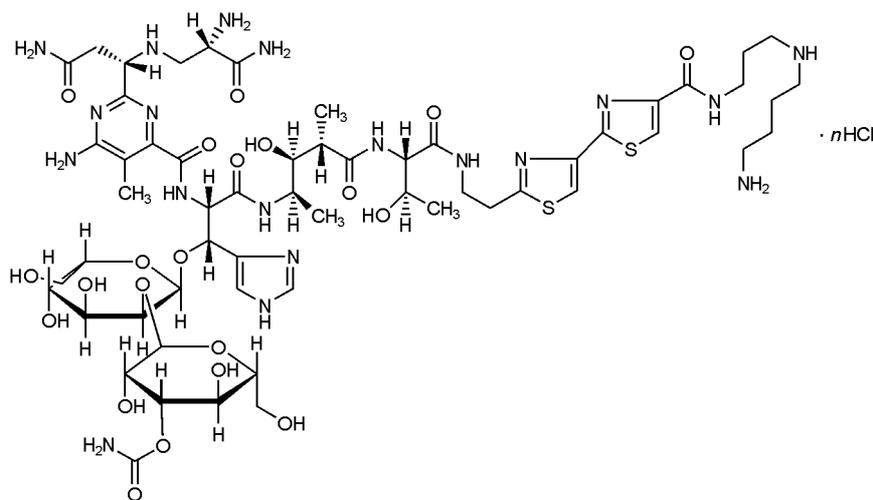


Figure 1 Chemical structure of pingyangmycin hydrochloride

检测器、柱温箱,日本日立公司);KH-1型微量泵控制器(中国科学院化学研究所);微渗析针管(上海医用激光仪器厂);MD-2310型同心圆型微渗析探针(Bioanalytical System Inc., USA)。

药品与试剂 盐酸平阳霉素(天津太河制药有限公司);戊烷磺酸钠(Tedia Company Inc., USA);肝素钠(天津生物化学制药厂);乙腈、甲醇为色谱纯(山东禹王实业有限公司禹城化工厂);水(二次重蒸水,自制)。其余试剂均为分析纯。

动物 家兔,雌雄兼用,体重2.0~2.5 kg,沈阳药科大学实验动物中心提供。

色谱条件 色谱柱:Supelco RP-amide  $C_{16}$ 柱(250 mm × 4.6 mm ID, 5  $\mu$ m);流动相:戊烷磺酸钠溶液(取戊烷磺酸钠0.96 g与乙二胺四醋酸二钠1.86 g,加0.08 mol·L<sup>-1</sup>醋酸溶液使溶解并稀释至1 000 mL,用氨溶液(调至pH 4.3)甲醇-乙腈(88:8:4);流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长:291 nm;柱温:40 °C。进样量20  $\mu$ L。

标准曲线 精密称取盐酸平阳霉素适量,用新鲜配制的生理盐水溶液配制成浓度分别为1.04, 2.08, 4.16, 8.32, 16.64, 33.28和66.56  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>的溶液。精密量取以上7个不同浓度的溶液20  $\mu$ L进样。

方法精密度实验 取上述2.08, 8.32和33.28  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>溶液,分别于同日内连续测定5次,得日内RSD。于连续5d内重复测定,得日间RSD。

微渗析探针的体外回收率 相对回收率R是指渗析液( $C_d$ )与组织液( $C_m$ )中药物浓度的比值,定义式为:

$$R = C_d - C_p / C_m - C_p$$

式中  $C_p$  为灌注液中的药物浓度。

将微渗析探针插入20 mL安瓿中,使探针的“有效渗析窗”全部浸入液面以下。安瓿中加入药物生理盐水溶液15 mL;灌注液的流速设定为3.0  $\mu$ L·min<sup>-1</sup>;以一系列浓度的药物生理盐水溶液为灌注液,分别为2.08, 4.16, 8.32, 16.64, 33.28和66.56  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>;安瓿中药物的质量浓度为10.40  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>。更换灌注液后,至少开泵冲洗0.5 h才开始收集下一个样品。以生理盐水为灌注液;搅拌子的转速约为200 r·min<sup>-1</sup>;水浴温度为(37 ± 0.5) °C。泵在设定的速度下运行0.5 h后,开始收集样品。每0.5 h收集1次,共收集3次,分别取20  $\mu$ L注入HPLC系统测定,取3次结果的平均值。

微渗析探针的植入 手术前30 min,家兔耳缘静脉注射2 500 U·kg<sup>-1</sup>肝素钠,以防止凝血。家兔耳缘静脉注射25%戊巴比妥麻醉,固定家兔于手术台上,切开颈部皮肤、皮下组织,暴露一侧颈外静脉,插入同心圆型微渗析探针(透析膜长10 mm),缝扎固定。

微渗析探针在体回收率 所有受试动物均进行在体探针回收率的测定(麻醉状态下)。微渗析探针植入家兔颈外静脉后,平衡2 h,依次以质量浓度分别为2.08, 4.16, 8.32, 16.64, 33.28和66.56  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>盐酸平阳霉素生理盐水溶液进行灌注,流速设定为3  $\mu$ L·min<sup>-1</sup>。更换灌注液后,至少冲洗0.5 h才开始取样。每一样品采集15 min,测定。

血中盐酸平阳霉素浓度的测定 以生理盐水溶液为灌注液,流速设定为3  $\mu$ L·min<sup>-1</sup>,冲洗2 h后,

静脉注射盐酸平阳霉素生理盐水溶液,剂量为  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (给药 1 次),同时开始收集样品,每隔 15 min 收集样品,所有样品立即进行测定。用相应的体内回收率将其换算成血液中的实际药物浓度 ( $C_{\text{blood}}$ ),公式如下:

$$C_{\text{blood}} = C_{\text{d}} / R$$

药代动力学分析 所得盐酸平阳霉素的血药浓度通过中国药理学学会数学专业委员会编制的 3P87 程序,根据实测值与理论值的相关性,曲线拟合优度, AIC 等指标,确定最佳房室模型,计算药代动力学参数。

## 结果

### 1 方法专属性色谱图

在选定色谱条件下,色谱图见图 2。1 为盐酸平阳霉素的色谱峰。可见盐酸平阳霉素色谱峰与其他色谱峰分离良好,保留时间为 13 min。

### 2 标准曲线与最低定量线

采用外标法,以峰面积定量。测得的数据经线性回归,标准曲线方程为:  $A = 6088.3C + 7314.9$  ( $r^2 = 0.9994$ ), 在  $1.04 \sim 66.56 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  线性关系良好。检测限为  $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 定量限为  $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 3 方法精密度测定

2.08, 8.32 和  $33.28 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  3 种不同浓度的

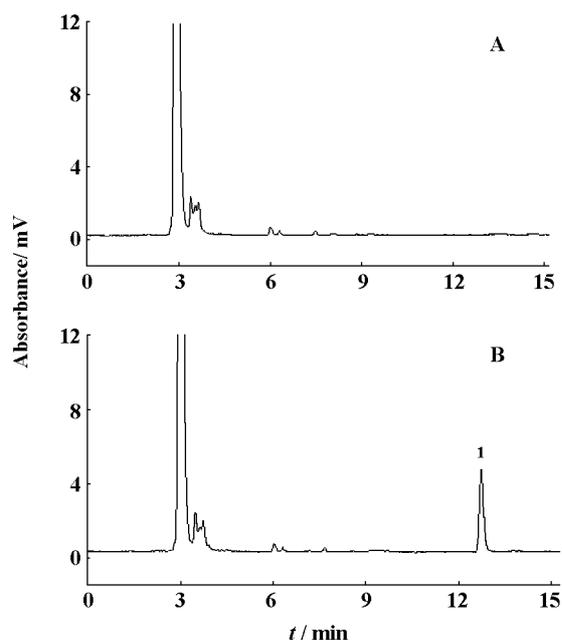


Figure 2 Typical chromatograms of blank blood dialysate sample (A) and blood dialysate sample containing PYM (B). 1: Pinyangmycin hydrochloride

盐酸平阳霉素溶液回收率分别为  $(99.7 \pm 1.8)\%$ ,  $(99.2 \pm 1.6)\%$  和  $(100.7 \pm 2.0)\%$ 。日内 RSD 分别为 1.8%, 1.6% 和 2.0%; 日间 RSD 分别为 1.8%, 2.0% 和 1.9%。

### 4 体外回收率的测定

在体外微渗析实验中,探针的回收率用浓差法<sup>[5]</sup>计算。根据相对回收率的定义式,以  $C_{\text{d}} - C_{\text{p}}$  对  $C_{\text{p}}$  作图,所得直线的斜率即为探针的回收率  $R$ 。渗析液和灌注液中的盐酸平阳霉素浓度差同灌注液中盐酸平阳霉素的浓度之间存在着良好的线性关系,  $C_{\text{d}} - C_{\text{p}} = -0.4305C_{\text{p}} + 4.5731$  ( $r^2 = 0.9993$ ) ( $n = 3$ )。直线与横轴的交点处的浓度 ( $10.62 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 为安瓿中药物浓度的测定值,与真实值 ( $10.40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 相近。探针的回收率 ( $x$  轴上方直线的斜率) 和传递率 ( $x$  轴下方直线的斜率) 是一致的 ( $43.0 \pm 2.4\%$ ), 为用反向渗析法测定在体回收率提供了实验依据。

### 5 在体回收率测定

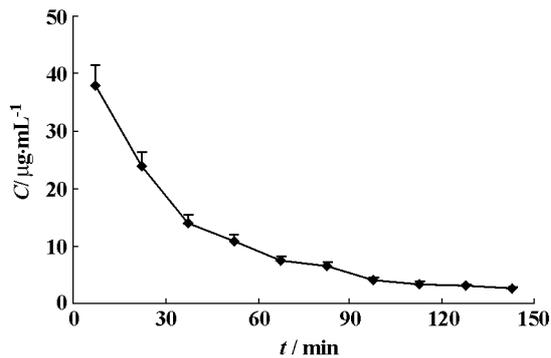
在体微渗析实验中,探针的回收率用反向渗析法<sup>[6]</sup>来计算。根据相对回收率的定义式,以  $C_{\text{d}} - C_{\text{p}}$  对  $C_{\text{p}}$  作图,所得直线的斜率即为探针的回收率  $R$ 。线性方程为:  $C_{\text{d}} - C_{\text{p}} = -0.428C_{\text{p}} - 0.5137$  ( $r^2 = 0.9988$ ), 回收率为  $(42.8 \pm 3.4)\%$  ( $n = 6$ )。

### 6 盐酸平阳霉素在家兔血中的药代动力学

经在体回收率的校正,平均血药浓度-时间曲线见图 3,经 3P87 拟合表明药-时曲线符合二室模型,主要药代动力学参数见表 1。

Table 1 Pharmacokinetic parameters of pinyangmycin hydrochloride in rabbit after intravenous administration of pinyangmycin hydrochloride at the dose of  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

Parameter	Value
$A / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$36 \pm 9$
$\alpha / \text{min}^{-1}$	$0.049 \pm 0.012$
$B / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$19 \pm 7$
$\beta / \text{min}^{-1}$	$0.012 \pm 0.003$
$V_{\text{d}} / \text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	$0.40 \pm 0.05$
$T_{1/2\alpha} / \text{min}$	$15 \pm 4$
$T_{1/2\beta} / \text{min}$	$60 \pm 15$
$K_{21} / \text{min}^{-1}$	$0.023 \pm 0.010$
$K_{10} / \text{min}^{-1}$	$0.08 \pm 0.13$
$K_{12} / \text{min}^{-1}$	$0.012 \pm 0.004$
$\text{AUC} / \mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$	$1931 \pm 116$
$\text{CL} / \text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	$0.010 \pm 0.001$



**Figure 3** Blood concentration-time profile of PYM ( $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , iv) obtained from microdialysis in rabbits ( $n = 6$ )

## 讨论

本文选用 RP-am ide  $C_{16}$  柱对盐酸平阳霉素进行分析。与  $C_{18}$  柱相比,由于键合了一个酰氨基,可使诸如盐酸平阳霉素这类极性较强的化学物质的保留时间延长,并可通过调整流动相中水相(含有离子对试剂)与有机相的比例,来控制该物质的保留时间,从而达到与其他色谱峰的分离。流动相中除甲醇外,加入乙腈改性剂可减弱色谱峰的拖尾,使得峰形对称性更好。

本实验以微渗析为取样手段进行盐酸平阳霉素药代动力学的研究。由于微渗析取样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,可直接进行样品分析,省去了繁琐的样品前处理步骤。因为每一动物均用自身做对照,这样不仅减少了实验误差,而且实验动物数可大大减少。该技术没有净液体交换,故可以进行连续和长时间的取样,且不会干预药物的药代动力学过程。这样就可获得长时间的药物

微渗析液的浓度时间曲线,从而得到足够的数据来分析药物的动力学性质。虽然发挥药物活性作用的是血液中的游离药物浓度,但测定游离药物浓度的方法准确度和精密度都很低,而且费用高,所以在药代动力学研究中人们常常测定的是总的药物浓度。微渗析技术能够在体测定血中游离药物的浓度,不包括与蛋白质结合的药物浓度,能真正代表发挥作用的游离型药物含量的变化<sup>[7]</sup>。

## References

- [1] Ding PT, Xu H, Zheng JM. Application of microdialysis in pharmacokinetic and drug metabolism studies [J]. Acta Pharm Sin (药理学报) 2002, 37: 316 - 320.
- [2] Dai Y, Liu XJ, Zhen YS. Antitumor effect of the novel immunoconjugate composed of pingyangmycin and anti-type IV collagenase monoclonal antibody [J]. Acta Pharm Sin (药理学报) 2006, 41: 41 - 46.
- [3] Tai KW, Li CK, Chou MY, et al. Relationship between intracellular glutathione level and the mode of cell death induced by pingyangmycin [J]. Oral Oncol, 2003, 39: 13 - 18.
- [4] Lin FT, Li DD, Yang XP, et al. Antitumor activity and preclinical pharmacologic evaluation of pinyangmycin [J]. Chin J Oncol (中华肿瘤杂志), 1979, 1: 161 - 166.
- [5] Ding PT, Wei G, Li H, et al. Study on the recovery of dialysis by concentration difference method [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2001, 36: 690 - 694.
- [6] Gao ZB, Ding PT, Zhang L, et al. Application of microdialysis to study the *in vivo* release of pingyangmycin from *in situ* gels in rabbits [J]. Biomed Chromatogr, doi: 10.1002/bmc.688. (in press).
- [7] Verbeeck RK. Blood microdialysis in pharmacokinetic and drug metabolism studies [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2000, 45: 217 - 228.