

利用稳定同位素内标微透析技术进行尼古丁脑局部药动学研究

吴秀君¹, 凌家俊^{1*}, 付 湘¹, 秦泽慧², 张英丰¹

(广州中医药大学 1. 中药学院; 2. 中药资源科学与工程研究中心, 广东 广州 510006)

摘要: 采用以稳定同位素为内标的微透析技术, 研究清醒自由活动下大鼠脑局部药动学过程。健康 SD 大鼠为研究对象, 以尼古丁 (nicotine) 为模型药物, 以氘代尼古丁 (deuterium labeled nicotine, DL-nicotine) 为微透析 (microdialysis, MD) 的内标物。样品采用 LC-MS/MS 法检测, 同时测定透析液中尼古丁及 DL-尼古丁的浓度。数据分析采用 DAS2.0 软件。经皮给予尼古丁后, 大鼠脑局部尼古丁的吸收和分布过程符合二室模型, 其中 $t_{1/2\alpha}$ 为 170.31 min, $t_{1/2\beta}$ 为 263.30 min, $AUC_{0-\infty}$ 为 $2.75 \times 10^5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$ 。DL-尼古丁可作为尼古丁的内标物进行探针回收率的校正; 稳定同位素内标微透析技术可实现尼古丁在清醒状态大鼠脑局部药动学的研究, 为戒烟方法的寻找及尼古丁经皮制剂的药动学-药效学相结合的研究提供了新思路。

关键词: 微透析; 稳定同位素; 尼古丁; 氘代尼古丁; 药动学

中图分类号: R969.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 03-0333-05

Study of pharmacokinetics of nicotine in local brain by using microdialysis and stable labeled isotope

WU Xiu-jun¹, LING Jia-jun^{1*}, FU Xiang¹, QIN Ze-hui², ZHANG Ying-feng¹

(1. Department of Chinese Medicine; 2. Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The paper is to report the study of pharmacokinetics of transdermal administered nicotine in the brain of freely moving rat by using microdialysis with stable labeled isotope as internal standard. The pharmacokinetic behavior of nicotine in Sprague Dawley rat brain was investigated after intranasal administration (3.75 mg). Brain fluid samples were collected by intracerebral microdialysis with DL-nicotine as internal standard. Concentrations of nicotine and DL-nicotine in the sample were measured by HPLC-MS/MS. Main pharmacokinetic parameters were calculated and analyzed by Das 2.0 pharmacokinetic software. The recovery of nicotine and the delivery of DL-nicotine were the same. The fate of absorption and distribution was two compartment model and the values of $t_{1/2\alpha}$ was 170.31 min, $t_{1/2\beta}$ was 263.30 min and the $AUC_{0-\infty}$ was $2.75 \times 10^5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$ separately. DL-nicotine can be used to calibrate the recovery of nicotine, and the new method of stable isotope microdialysis can be used to study the pharmacokinetics of freely moving rat. It will make sense for the treatment of addiction of tobacco and provide a new thought for the research of pharmacokinetics-pharmacodynamic combination.

Key words: microdialysis; stable labeled isotope; nicotine; DL-nicotine; pharmacokinetics

收稿日期: 2010-10-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772791; 30701097); 广东省科技计划项目 (2010B030700035).

*通讯作者 Tel: 86-20-39358043, E-mail: ljj@gzhtcm.edu.cn

烟草中的尼古丁是吸烟成瘾的物质基础^[1-3]。长期吸烟可成瘾、产生身体和精神的依赖性,中止吸烟后出现戒断症状;再吸烟(或给予尼古丁)可缓解症状^[4, 5]。目前,尼古丁经皮给药是公认的最佳替代疗法^[6, 7]。微透析(microdialysis, MD)最早应用于脑脊液化学环境的研究,它通过特有的装置,将具有半透膜的 MD 探针植入脑组织,用与脑组织等渗的灌流液持续灌流探针,组织中的待测药物随浓度梯度扩散进入灌流液,通过测定透析液中药物浓度,从而间接得到脑细胞外液待测物质的浓度^[8, 9]。它可实现脑组织中药物浓度的连续、实时、在体的监测,现已应用到药动力学研究的各领域,如药物分布、代谢方面的研究^[10-14],以及生物利用度和生物等效性评价^[15-18]。稳定同位素内标微透析技术是将稳定同位素作为待测物的微透析内标物,可通过内标的释放率与待测物的回收率的关系(P)来考察药物的在体回收率,从而最终计算出体内药物的真实浓度。

材料与方 法

药品和试剂 尼古丁贴剂(McNeil Sweden AB);尼古丁对照品(纯度99%, Labor Dr Ehrenstorfer, 德国);DL-尼古丁(纯度 $\geq 98\%$, Cambridge Istotabe Laboratories, Inc.)。

实验动物 健康SD大鼠(体重245~260 g,雌雄各半),广州中医药大学实验动物中心SCXK(粤)2008-0020。

微透析系统 采用瑞士CMA公司生产的微透析(microdialysis, MD)系统:推进泵(CMA 402 Syringe Pump)、灌注器(CMA 1.0 mL Exmire MicroSyringe)、清醒MD活动装置(CMA/120)、脑部探针(CMA/12)、探针导管(CMA/12)、大鼠用脑立体定位仪(深圳瑞沃德公司)、灌流液(含有内标DL-尼古丁的人工脑脊液)。

分析系统 TSQ Quantum Access 质谱仪、Surveyor 液相色谱仪、Xcalibur 2.0 工作站(Thermo Fisher, USA);Hypersil Gold C₁₈柱(150 mm \times 2.1 mm, 3 μ m, Thermo, USA)。

统计学处理 采用DAS2.0软件进行数据分析及处理。

人工脑脊液(ECF)的配制 精密称取NaCl、KCl、CaCl₂、无水MgCl₂分别为8.59、0.20、0.13和0.08 g,置1 L量瓶加重蒸馏水溶解并稀释至刻度,摇匀,0.22 μ m微孔滤膜滤过,备用。

对照品储备液的配制 取尼古丁和DL-尼古丁对照品适量,精密称定,分别用甲醇溶解并稀释制成2 mg·mL⁻¹的溶液,0.22 μ m微孔滤膜滤过,临用前用ECF溶液稀释成所需要的浓度。

检测方法 采用本课题组建立的检测方法^[19]——LC-MS/MS法。流动相:乙酸铵(2 mmol·L⁻¹)—甲醇(30:70);流速:0.21 mL·min⁻¹;进样量:5 μ L。离子源为大气压电喷雾离子源(ESI);正离子检测;喷雾电压:3.0 kV;鞘气压力:25 psi(1 psi \approx 6.9 kPa);辅助气流量:5 arb;金属离子传输毛细管温度:300 $^{\circ}$ C;碰撞能量:25 eV;扫描方式:选择反应监测(SRM),用于定量分析的离子对为 m/z 163/130(尼古丁), m/z 166/130(DL-尼古丁)。

P 值的校正

流速对 P 值的影响 将探针置于含有尼古丁(500 ng·mL⁻¹)的溶液中,匀速搅拌,用含有内标的灌流液(172 ng·mL⁻¹)依次在不同流速下(0.5、1、2、3和4 μ L·min⁻¹)灌流,每种流速下平行收集4份透析样品,每份各50 μ L,通过LC-MS/MS法测定透析液中尼古丁含量(C'_{nic})和DL-尼古丁含量(C'_{DL})、透析探针外环境中尼古丁含量(C_{nic})与灌流液中DL-尼古丁的含量(C_{DL})。用增量法(公式1)计算尼古丁的回收率,用减量法(公式2)计算DL-尼古丁的流速下的释放率;而 $P=R_{\text{drug}}(\%)/R_{\text{calibrator}}(\%)$ 。

$$R_{\text{drug}}(\%) = \frac{C'_{\text{nic}}}{C_{\text{nic}}} \quad (1)$$

$$R_{\text{calibrator}}(\%) = \frac{C_{\text{DL}} - C'_{\text{DL}}}{C_{\text{DL}}} \quad (2)$$

浓度对 P 值的影响 将探针依次浸泡在4种不同浓度的尼古丁溶液(C_{nic})中,浓度依次约为57、570、1 140和2 280 ng·mL⁻¹,用含DL-尼古丁(172 ng·mL⁻¹)的灌流液以3 μ L·min⁻¹灌注、平衡;平衡后收集透析液4份,每份50 μ L,每更换一种透析溶液均需灌流平衡30 min再取样。测定透析液中两者的浓度并用公式1计算尼古丁的回收率,通过公式2计算DL-尼古丁的释放率。

P 值的在体校正 将大鼠用20%乌拉坦(0.8 mL·kg⁻¹, ip)麻醉;探针植入健康雄性SD大鼠的颈静脉,用4组不同浓度的混合灌流液(同时含有尼古丁和DL-尼古丁的人工脑脊液)进行灌流,每换一个浓度组进行灌流平衡60 min,平衡后共取透析液4份,每份50 μ L,测定灌流液及透析液中尼古丁及DL-尼古丁的浓度,按照减量法公式(公式2)计算两者的释放率从而计算出 P 值。

尼古丁经皮给药的脑局部药动学研究

取样前准备 大鼠用 10% 水合氯醛 (每 100 g 体重 0.3 mL, ip) 麻醉, 并将颅顶、颈后及背部连接处脱毛; 将大鼠固定于脑立体定位仪, 暴露颅骨; 取右侧纹状体区 (AP: +0.2 mm, ML: -3.2 mm, DV: -3.0 mm), 用颅钻在所定位处钻孔并将套管植入脑部; 用牙粉将套管层层固定; 将大鼠放回笼中静养 2 日, 在此期间, 被损坏的脑组织和皮肤将得到修复。

经皮给药及取样 将已埋置套管的大鼠用乙醚麻醉, 探针沿套管植入纹状体区, 将大鼠放入清醒动物活动装置并连接探针、MD 泵及清醒装置; 用内标液 (含 DL-尼古丁约 200 ng·mL⁻¹ 的人工脑脊液) 以 2 μL·min⁻¹ 的流速灌流平衡 1 h; 平衡结束取空白透析液; 尼古丁贴剂按 3.5 mg/只的剂量贴在大鼠颈后已脱毛的部位, 以给药的瞬间为零时刻开始计时, 每隔 20 min 取样一次, 共取样 600 min; 透析液放置于 -80 °C 保存待测。

脑部尼古丁浓度的换算 在上述检测条件下测定灌流液中 DL-尼古丁的浓度 C_{DL} 、透析液中尼古丁的浓度 C'_{nic} 和 DL-尼古丁的浓度 C'_{DL} 。经体内外校正得知, $R_{drug}(\%)$ 与 $R_{calibrator}(\%)$ 的比值 P 为 1, 因此, 脑局部尼古丁的实际浓度 C_{nic} 为:

$$C_{nic} = C'_{nic} \times R_{drug}(\%) \approx C'_{nic} \times R_{calibrator}(\%) = \frac{C'_{nic} \times C_{DL}}{C_{DL} - C'_{DL}} \quad (3)$$

结果

1 检测方法考察

结果表明, 尼古丁和 DL-尼古丁峰形良好 (图 1), 主峰前后无杂质峰干扰, 出峰时间约 2.7 min。尼古丁在 20.67~20.67×10⁻³ ng·mL⁻¹ 内峰面积与进样浓度呈线性关系, 线性回归方程 $y = 1\,008\,964.41x - 12\,248.53$, $r = 0.999\,7$; DL-尼古丁在 22.47~22.47×10⁻³ ng·mL⁻¹ 内峰面积与进样浓度呈线性关系, 线性回归方程为 $y = 986\,938x + 22\,158$, $r = 0.999\,6$ 。尼古丁与 DL-尼古丁的定量下限 (按 S/N>10 计算) 分别为 20.67 和 22.47 ng·mL⁻¹。本方法的精密度良好, RSD < 15%, 符合生物样品分析方法的精密度要求。

2 P 值的考察

2.1 流速对 P 值的影响 分别计算各流速下尼古丁的回收率及 DL-尼古丁释放率, 并在此基础上计算出平均 P 值和标准偏差。计算得 $P = 0.99 \pm 0.03$ 。

2.2 浓度对 P 值的影响 计算各流速下浓度尼古丁及 DL-尼古丁的回收率及释放率并在此基础上计算出平均 P 值和标准偏差。计算得 $P = 1.01 \pm 0.04$ 。

2.3 P 值的在体校正 计算各浓度组下的尼古丁及 DL-尼古丁释放率, 并求两者平均释放率之比 P 值和标准偏差。计算得 $P = 1.00 \pm 0.01$ 。

结果表明, P 值不随环境中待测物灌流速度和浓度的变化而改变, 且经体内、外的校正, P 值均约为 1, 即 $R_{drug}(\%) = R_{calibrator}(\%)$ 。因此, 利用 MD 取样时, 可

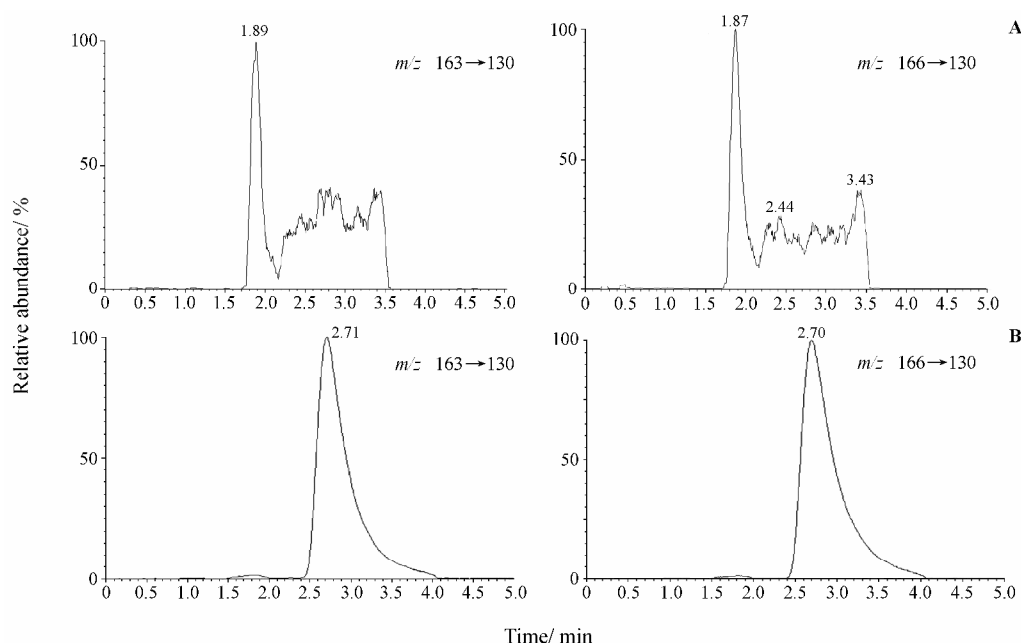


Figure 1 Typical SRM chromatograms of blank and nicotine standards. A: Artificial cerebrospinal fluid (blank); B: Standard mixture in artificial cerebrospinal fluid. Nicotine: m/z 163→130; DL-nicotine: m/z 166→130

以用 DL-尼古丁在体的释放率 $R_{\text{calibrator}}$ (%) 代替尼古丁的在体回收率 R_{drug} (%), 从而计算出尼古丁的浓度。

3 脑局部药动学

经内标法校正后可得到脑部尼古丁的真实浓度, 通过平行实验, 求出各时间点上尼古丁的平均浓度 C , 用药动学软件 DAS2.0 拟合房室模型并得到尼古丁经皮给药后平均 C - T 曲线 (图 2) 和主要药动学参数 (表 1)。

Table 1 Pharmacokinetic parameters of nicotine in rat. $n = 6$

Parameter	Value
A	0.004
B	0.003
$t_{1/2\alpha}$ /min	170.31
$t_{1/2\beta}$ /min	263.30
C_{max} / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	476.16
t_{max} /min	240
$\text{AUC}_{0-\infty}$ / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$	2.75×10^5
AUC_{0-7} / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$	2.05×10^5

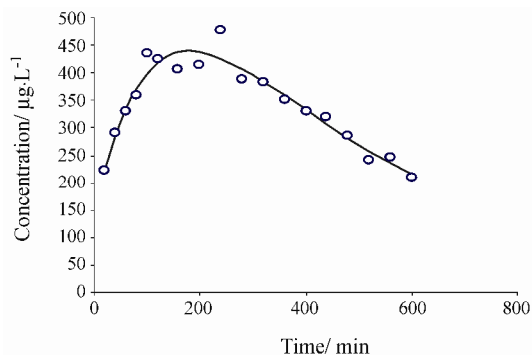


Figure 2 Mean plasma concentration-time curve of nicotine

结果表明, 尼古丁经皮给药后, 大鼠脑局部的尼古丁浓度在 0~170 min 内呈上升的趋势; 在 240 min 左右, C_{nic} 达最高值 $476.16 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 在 100~300 min 内, 药物浓度处于相对稳定状态; 随后药物浓度开始缓慢下降; 实验结束取样时, 脑局部仍可检测出尼古丁。

讨论

在体回收率是折算药物实际浓度的关键因素^[20]。药物在体内的浓度可变且未知, 且长时间的取样过程中体内环境和探针的性能都在变化^[21], 因此, 探针的在体回收率需要进行体外校正^[22, 23]。目前, 反透析法是最常用的校正法^[24, 25]。内标法属于反透析法的一种, 它通过体外实验求得内标的释放率与待测物的回收率的关系 (P) 来折算待测药物的在体回收率^[26-28]。寻找与待测物扩散性质一致的内标物是引

入此法的关键。由于稳定性同位素有着与待测药物相近的分子量、结构式和理化性质, 安全无污染^[29-31], 可消除内标物与待测物之间由于理化性质的差异而导致的误差, 所以与普通的内标法相比, 稳定同位素内标微透析技术可获得每个取样点的真实瞬间回收率^[32, 33]。通过体外的验证及体内的研究可证实, 稳定同位素内标微透析技术方法可应用到尼古丁经皮给药的药动学研究。

生物样品易降解且尼古丁及 DL-尼古丁见光易分解、挥发, 因此, 取样结束后要实现样品快速检测; 人工脑脊液含有无机盐, 经长时间的检测可以观察到喷雾扫锥上有盐分沉积, 为防止金属离子传输管的堵塞, 在检测过程中要不断对系统进行清洗维护。

本研究和市售尼古丁戒烟贴的药动学研究结果^[34]稍有差别, 原因在于: 血药浓度法是采集血液样本, 而本研究的取样部位为脑部, 两者的吸收和分布有差别; 血药浓度法是麻醉状态下的取样, 而本实验为清醒状态下取样, 两种状态下药物的吸收分布过程会产生差异。尼古丁在脑部产生吸收和分布, 其戒除烟瘾的机制是调节脑部兴奋和抑制性神经递质的分泌^[35, 36]。因此, 开展尼古丁脑局部药动学的研究对其戒除烟瘾的治疗方法探究有着深刻的意义, 同时为尼古丁的药动学-药效学相结合的研究提供了基础。

References

- [1] He XY, Xu X, Shen J. Critical amino acid residues for nicotine 5'-hydroxylation in human CYP2A enzymes [J]. J Nanjing Med Univ (南京医科大学学报), 2008, 22: 338-345.
- [2] Jarvis MJ. Why people smoke [J]. Br Med J, 2004, 328: 277-279.
- [3] Pisinger C, Jorgensen T. Waist circumference and weight following smoking cessation in a general population: the inter 99 study [J]. Prev Med, 2007, 44: 290-295.
- [4] Isola R, Zhang HL, Gopi A, et al. Acute nicotine changes dynorphin and prodynorphin mRNA in the striatum [J]. Psychopharmacology, 2009, 201: 507-516.
- [5] Piccirito MR, Corrigan WA. Neuronal systems underlying behaviours related to nicotine addiction: neural circuits and molecular genetics [J]. J Neurosci, 2002, 22: 3338-3341.
- [6] George TP, O' Malley SS. Current pharmacological treatments for nicotine dependence [J]. Trends Pharmacol Sci, 2004, 25: 42-48.
- [7] Volodymyr IP, Jun N, Areola OO, et al. Nicotinic cholinergic synaptic mechanisms in the ventral tegmental area contribute to nicotine addiction [J]. Learnmem, 2009, 11: 60-69.
- [8] Müller M. Science, medicine, and the future: microdialysis

- [J]. *Br Med J*, 2002, 324: 588–591.
- [9] Peerdman SM, van Tulder MW, Vandertop WP, et al. Cerebral microdialysis as a monitoring method in subarachnoid hemorrhage patients, and correlation with clinical events—a systematic review [J]. *J Neurol*, 2003, 250: 797–805.
- [10] Kreilgaard M. Dermal pharmacokinetics of microemulsion formulations determined by *in vivo* microdialysis [J]. *Pharm Res*, 2001, 18: 367–373.
- [11] Kreilgaard M, Kemme MJ, Burggraaf J, et al. Influence of a microemulsion vehicle on cutaneous bioequivalence of a lipophilic model drug assessed by microdialysis and pharmacodynamics [J]. *Pharm Res*, 2001, 18: 593–599.
- [12] Jonhagen S, Ackermann P, Saartok T, et al. Calcitonin generelated peptide and neuropeptide Y in skeletal muscle after eccentric exercise: a microdialysis study [J]. *Br J Sports Med*, 2006, 40: 264–267.
- [13] Lecca D, Cacciapaglia F, Valentini V, et al. Preferential increase of extracellular dopamine in the rat nucleus accumbens shell as compared to that in the core during acquisition and maintenance of intravenous nicotine self-administration [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2006, 184: 435–436.
- [14] Ding PT, Xu H, Zheng JM. Application of microdialysis in pharmacokinetic and drug metabolism studies [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2002, 37: 316–320.
- [15] Jia SC, Ding PT. Cutaneous permeation kinetics and pharmacodynamics of topical lidocaine gel in rat [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2003, 38: 631–633.
- [16] Wei G, Ding PT, Zheng JM, et al. Pharmacokinetics of timolol in aqueous humor sampled by microdialysis after topical administration of thermosetting gels [J]. *Biomed Chromatogr*, 2006, 20: 67–71.
- [17] Lü YF, Hu X, Bi KS. Effects of ligustrazine on extracellular acetylcholine levels in rat brain dialysate [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 1128–113.
- [18] Gao QZ, Yang LY, Ding PT, et al. Permeation of meloxicam with two enhancers in rats by microdialysis [J]. *J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报)*, 2008, 25: 178–182.
- [19] Ling JJ, Chen L, Xu H. Development of LC-MS/MS method for simultaneous determination of nicotine and DL-nicotine in microdialysis samples [J]. *Res Pract Chin Med (现代中药研究与实践)*, 2010, 24: 71–74.
- [20] Kabir MA, Taft DR, Joseph CK, et al. Measuring drug concentrations using pulsatile microdialysis: theory and method development *in vitro* [J]. *Int J Pharm*, 2005, 293: 171–182.
- [21] Jia SC, Ding PT. The effect of pH on the permeation of lidocaine hydrochloride across excised rat skin [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2001, 10: 133–135.
- [22] Martínez Martínez MS, Gutiérrez Hurtado B, Colino Gandarillas C, et al. *In vitro* study of experimental factors affecting the microdialysis results [J]. *Anal Chim Acta*, 2002, 459: 143–150.
- [23] Gao ZB, Ding PT. The determination of *in vitro* Pingyangmycin hydrochloride plasma protein binding by microdialysis [J]. *Pharmazie*, 2007, 62: 115–116.
- [24] Ling JJ, Li R. *In vitro* experiment for detecting microdialysis recovery rate of sinomenine [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med (广州中医药大学学报)*, 2005, 22: 56–59.
- [25] Gao P, Ding PT, Xu H, et al. *In vitro* and *in vivo* characterization of huperzine A loaded microspheres made from end-group uncapped poly (*d, l*-lactide acid) and poly (*d, l*-lactide-co-glycolide acid) [J]. *Chem Pharm Bull*, 2006, 54: 89–93.
- [26] Lonnroth P, Strindberg L. Validation of the ‘internal reference technique’ for calibrating microdialysis catheters *in situ* [J]. *Acta Physiol Scand*, 1995, 153: 375–380.
- [27] Ding PT, Xu H. Transdermal delivery study of ondansetron by cutaneous microdialysis in rat [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2000, 35: 305–307.
- [28] Ding PT, Xu H, Wei G, et al. Microdialysis sampling coupled to HPLC for transdermal delivery study of ondansetron hydrochloride in rat [J]. *Biomed Chromatogr*, 2000, 14: 141.
- [29] Chen X, Ling JJ. Study on the *in vitro* microdialysis recovery of nicotine and its influence factors [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med (广州中医药大学学报)*, 2010, 27: 159–163.
- [30] Isola R, Zhang HL. Acute nicotine changes dynorphin and prodynorphin mRNA in the striatum [J]. *Psychopharmacology*, 2009, 201: 507–516.
- [31] Liang JP, Wei ZQ, Zhang L, et al. Recent progress of stable isotopes study on pharmacokinetics [J]. *Nucl Phys Rev*, 1998, 12: 111–113.
- [32] Lester HA, Xiao C, Srinivasan R, et al. Nicotine is a selective pharmacological chaperone of acetylcholine receptor number and stoichiometry—implications for drug discovery [J]. *AAPS J*, 2009, 11: 167–177.
- [33] Sasongko L, Williams KM, Ramzan I, et al. Assessment of *in vitro* and *in vivo* recovery of gallamine using microdialysis [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2000: 519–525.
- [34] French KL, Granholm AC, Moore AB, et al. Chronic nicotine improves working and reference memory performance and reduces hippocampal NGF in aged female rats [J]. *Behav Brain Res*, 2006, 169: 256–262.
- [35] Xi ZX, Spiller K, Gardner EL, et al. Mechanism-based medication development for the treatment of nicotine dependence [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30: 723–739.
- [36] Liao RM, Zhou X. Progress of smoking cessation drugs [J]. *World Clin Drugs (世界临床药物)*, 2009, 11: 695–696.