

磷酸川芎嗪鼻用 pH 敏感型原位凝胶对急性脑缺血模型大鼠脑中氨基酸含量的影响

刘宏伟¹, 晏亦林^{2*}, 余金明¹, 任旻琮¹, 谭敏¹, 陈靖¹ (1.常德职业技术学院, 湖南 常德 415000; 2.广东食品药品职业学院, 广州 510520)

摘要: 目的 建立大鼠脑中 5 种氨基酸浓度的高效液相-荧光检测器测定法(HPLC-FD), 研究磷酸川芎嗪(TMPP)鼻用 pH 敏感型原位凝胶对急性脑缺血模型大鼠脑部纹状体区氨基酸含量的影响。方法 微透析液用 Agilent 1100 液相系统荧光检测器检测, ZORBAX SB-Aq C₁₈ 色谱柱, 激发波长 357 nm, 发射波长 455 nm; 流动相为甲醇和 50 mmol·L⁻¹ 乙酸钠缓冲液(pH=6.5), 梯度洗脱, 流速为 1 mL·min⁻¹。12 只 ♂ 大鼠随机分成模型对照组和给药组, 每组 6 只, 用微透析采样方法采集大鼠脑部纹状体区微透析液后, HPLC-FD 测定微透析液中 5 种氨基酸的浓度。结果 鼻腔给予 TMPP 鼻用 pH 敏感型原位凝胶(10 mg·kg⁻¹)后, 给药组大鼠体内的 Glu 和 Asp 与对照组相比显著下降, 而 Tau 和 GABA 的量却有所增加。结论 TMPP 能明显降低模型大鼠脑内兴奋性氨基酸的含量, 增加脑内抑制性氨基酸的含量, 对急性脑缺血模型大鼠起到保护作用。

关键词: 高效液相-荧光检测法; 磷酸川芎嗪鼻用 pH 敏感型原位凝胶; 氨基酸; 脑微透析; 急性脑缺血大鼠模型

中图分类号: R969.11

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)09-0929-05

Influence of Nasal Tetramethylpyrazine Phosphate pH-Sensitive in Situ Gel on Amino Acid Content in Rats Brain of Acute Cerebral Ischemia Model

LIU Hongwei¹, YAN Yilin^{2*}, SHE Jinming¹, REN Minqiong¹, TAN Min¹, CHEN Jing¹ (1.Changde Vocational Technical College, Changde 415000, China; 2.Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a determination method for 5 kinds of amino acid in rats with high performance liquid-fluorescence detector. To study the effects of tetramethylpyrazine phosphate(TMPP) on amino acid content in acute cerebral ischemia rats model. **METHODS** Microdialysis fluid was determined with Agilent 1100 liquid system fluorescence detector, ZORBAX SB-Aq C₁₈ chromatographic column was applied. Excitation wavelength and emission wavelength were set at 357 nm and 455 nm, respectively, mobile phase consisted of methanol and 50 mmol·L⁻¹ sodium acetate buffer (pH=6.5), with gradient elution, the flow rate was 1 mL·min⁻¹. Twelve male rats randomly divided into model control group and treatment group, each group had 6. Microdialysis was used to collect samples in striatum of rats area after dialysate, five kinds of amino acid concentration was determined by HPLC-FD. **RESULTS** Glu and Asp levels in TMPP group were decreased significantly compare with control group, however, the amount of Tau and GABA increased. **CONCLUSION** TMPP can obviously reduce excitatory amino acid content and increase brain inhibitory amino acid content in model rats, which has protect effect on acute cerebral ischemia rats.

KEY WORDS: HPLC-FD; tetramethylpyrazine phosphate pH-sensitive in situ gel; amino acid; brain microdialysis; acute cerebral ischemia rat model

脑血管疾病是导致我国中老年人死亡的首要原因, 其中又以缺血性脑血管病发病率最高。脑缺血时, 由于各类氨基酸大量释放, 兴奋性氨基酸与抑制性氨基酸间平衡被破坏, 这是导致神经元急性和迟发性“兴奋毒”损伤的关键因素^[1]。川

芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP)是从川芎总生物碱中分离出来的一种具有多种生物活性的酰胺类生物碱, 其化学结构为四甲基吡嗪^[2]。磷酸川芎嗪(tetramethylpyrazine phosphate, TMPP)为其磷酸盐, 具有活血、化瘀、理气功能, 临床上常用于

基金项目: 国家自然科学基金项目(30801551); 广东省自然科学基金项目(8451052005001186)

作者简介: 刘宏伟, 女, 博士, 讲师 Tel: 15080603524 E-mail: lhw359@163.com *通信作者: 晏亦林, 女, 博士, 教授 Tel: (020)28854912 E-mail: yilin_yan@sina.com

脑血管疾病的治疗^[3]。动物实验研究表明, TMP 可通过多种途径对缺血脑损伤起保护作用^[4], 但有关保护机制尚不清楚。本实验运用微透析采样技术实时采集急性脑缺血模型大鼠纹状体区脑脊液, HPLC-FD测定脑脊液中氨基酸的含量, 并观察鼻腔给予 TMPP 鼻用 pH 敏感型原位凝胶 (10 mg·kg⁻¹)^[5]后, TMPP对急性脑缺血大鼠模型中氨基酸的影响, 探讨TMPP对脑缺血神经保护作用与氨基酸的关系。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 荧光检测器液相系统(Agilent 公司); 68001 型单臂脑立体定位仪(包括微型手持式颅钻, 钻头直径 1.2 mm, 深圳瑞沃德生命科技有限公司); BAS 微透析系统: MD0100 灌注器、MD1001 灌注器推进泵、MD1002 灌注器支架、MD1000 流速控制器(BAS 公司); 脑微透析探针: CMA/12, 4 mm membrane window, cut-off 20k dalton(瑞士 CMA 公司生产, 购于北京泰德金生物技术开发中心)。

1.2 药品及试剂

谷氨酸(Glu)、天门冬氨酸(Asp)、甘氨酸(Gly)、 γ -氨基丁酸(GABA)、牛磺酸(Tau)(Sigma 公司); 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC, 天津市福晨化学试剂厂); 多聚甲醛(上海协瑞实业发展有限公司); 乌拉坦(上海国药集团化学试剂有限公司); 邻苯二甲醛(OPA, 国药集团化学试剂有限公司); β -巯基乙醇(Sigma 公司); 甲醇为色谱纯(迪马公司, 批号: 20080915); 其他试剂均为分析纯试剂。

1.3 动物

健康 SD 大鼠, δ , 体质量 300~350 g, 广东省医学实验动物中心提供, 合格证号: SKXK(粤)2008-0002。

2 方法与结果

2.1 人工脑脊液的配制

人工脑脊液参照 CMA 公司公布的的处方配制: 氯化钠 147 mmol·L⁻¹, 氯化钙 1.2 mmol·L⁻¹, 氯化钾 2.7 mmol·L⁻¹, 氯化镁 0.85 mmol·L⁻¹, 溶剂为双蒸水。配制后用 0.22 μ m 的水系微孔滤膜过滤, 超声脱气后使用。

2.2 TMPP 鼻用 pH 敏感型原位凝胶的制备

取适量的 Carbopol 和 HPMC 分别配成不同浓度的溶液, 放置 24 h 使其充分溶胀, 分散均匀,

再将两者混合均匀得到空白凝胶。含药凝胶的制备是将药物溶于蒸馏水后混入空白基质中, 搅拌均匀后用三乙醇胺调节 pH 值至 5.5 左右即可。

2.3 衍生化试剂的配制及衍生反应

2.3.1 衍生试剂的配制 称取 OPA 10 mg 溶于 0.25 mL 甲醇中, 加入 20 μ L β -巯基乙醇, 再加入 2 mL 0.2 mol·L⁻¹ 硼砂缓冲液(pH=9.5), 混匀。摇匀后离心取上清液, 充氮气置于暗处存放 24 h 后即可使用。隔天补加 10 μ L β -巯基乙醇。

2.3.2 衍生化反应 取 5 μ L 衍生剂于装有 15 μ L 微透析样品液的内衬管中混匀, 静置 2 min 后进样。氨基酸对照品溶液的衍生反应同上。

2.4 色谱条件

Agilent ZORBAX SB-Aq C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μ m)柱, 激发波长 357 nm, 发射波长 455 nm; 柱温: 25 $^{\circ}$ C, 流动相: A 为甲醇, B 为 50 mmol·L⁻¹ 乙酸钠缓冲液(pH=6.5), 梯度洗脱程序: 0~3 min: 25%流动相 A, 75%流动相 B; 8 min: 35%流动相 A, 65%流动相 B; 23~25 min: 45%流动相 A, 55%流动相 B; 30 min: 25%流动相 A, 75%流动相 B, 流速为 1 mL·min⁻¹。色谱图见图 1。由图 1 可知, 所选择的色谱条件在空白脑透析液无杂峰干扰, 具有较好的专属性。

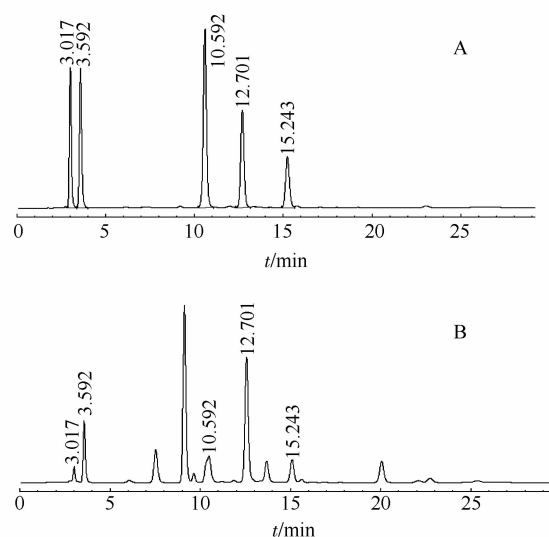


图 1 测定氨基酸含量的高效液相色谱图

A-氨基酸对照品(Asp: t_R =3.017 min; Glu: t_R =3.592 min; Gly: t_R =10.592 min; Tau: t_R =12.701 min; GABA: t_R =15.243 min); B-脑部微透析样品

Fig 1 HPLC spectrum of amino acid

A-amino acid standard(Asp: t_R =3.017 min; Glu: t_R =3.592 min; Gly: t_R =10.592 min; Tau: t_R =12.701 min; GABA: t_R =15.243 min); B-brain microdialysis sample

2.5 标准曲线的制备

精密称取一定量的 5 种氨基酸(Asp、Glu、Gly、Tau、GABA)对照品适量, 分别置于棕色的量瓶中, 加入人工脑脊液充分震荡使其溶解后定容得到浓度为 0.1 mg·mL⁻¹, 作为对照品储备液, 对照品储备液可在 4 °C 冰箱中储存一周。以不同浓度氨基酸标准品衍生后进样, 测得其浓度与峰面积比的回归方程、线性范围及最低检测浓度(以 S/N≥3 计), 结果见表 1。

表 1 不同浓度氨基酸的保留时间、回归方程和线性范围
Tab 1 The retention time, standard curve, correlation coefficient, linear range, detection limit of amino acids

氨基酸	保留时间/ min	标准曲线	R ²	线性范围/ μg·mL ⁻¹	检测限/ ng·mL ⁻¹
Asp	3.017	Y=83.25X+7.442	0.999	0.0109~10.9	5.19
Glu	3.592	Y=282.5X+26.55	0.998	0.0104~10.4	2.12
Gly	10.592	Y=447.9X+97.42	0.997	0.0114~11.4	0.55
Tau	12.701	Y=249.7X+15.57	0.999	0.0102~10.2	1.89
GABA	15.243	Y=297.3X+30.14	0.999	0.0125~12.5	2.16

2.6 精密度试验

分别精密吸取 1 μg·mL⁻¹ 的各氨基酸对照品溶液 15 μL, 加入 5 μL 衍生剂, 混匀 2 min 后进样, 每种氨基酸对照品溶液连续进样 6 次, 记录峰面积。结果精密度良好, Asp、Glu、Gly、Tau、GABA 的 RSD 分别为 0.9%, 1.0%, 1.9%, 2.8%, 1.7%。

2.7 药效学研究

2.7.1 线栓的制作 取直径 0.26 mm 尼龙鱼线 50 mm, 一端酒精灯加热使之成光滑球面, 再在此段蘸腊使其球面段光滑, 并在距球面 18~20 mm 处作标记, 然后浸泡在多聚赖氨酸溶液中少许时间, 自然风干后备用。

2.7.2 药效学研究 取 SD 大鼠 12 只, ♂, 随机分成 2 组, 每组 6 只, 一组为模型对照组, 一组造模后鼻腔给予自制的 TMPP 鼻用 pH 敏感型原位凝胶(10 mg·kg⁻¹)。实验前 24 h 禁食不禁水, 用 20% 乌拉坦生理盐水溶液(0.6 mL·100g⁻¹)腹腔注射麻醉, 将其头部固定于立体定向仪上, 减去顶部皮毛, 消毒皮肤后沿中线右侧切开头皮分离骨膜显露顶骨, 立体定位仪定位纹状体区^[6](AP: +0.2 mm, ML: ±3.2 mm, DV: -7.0 mm), 用颅钻钻一直径 1.2 mm 小孔, 将探针引导管经此小孔置入脑内, 并用牙托粉固定, 保证引导管不松动。插入脑部

探针并灌流。然后采用改良的 Zea-longa 线栓法^[7]建立大鼠急性脑缺血模型。将动物取仰卧位, 分离出左侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA), 并穿线备用。待脑部探针灌流 1 h 后, 收集 2 份空白灌注液, 每份收集 15 min。然后结扎 CCA 近心端及 ECA, 将尼龙鱼线经 ICA 送至颅内。给药组待鱼线插入颅内后马上给药并开始收集灌流液, 动物温度器将大鼠体温控制在 37 °C。每间隔 15 min 收集 1 次样品约 30 μL(冰上收集), 共收集 3 h, 第 4 h 每 20 min 收集一个样品, 收集样品后测定氨基酸类神经递质的含量。实验前测探针的体外回收率。实验结束后, 动物处死取脑, 冰冻 1 h 左右后将前脑切片, TTC 染色观察梗死灶。

2.7.3 大鼠脑组织切片染色观察 急性脑缺血模型大鼠的大脑经 TTC 染色后, 血供正常的组织呈鲜红色, 缺血或梗死的组织呈白色, 模型组大鼠经造模后大脑均有不同程度的缺血或梗死组织出现。

2.7.4 探针体外回收率的测定 每支探针在使用前, 将探针浸泡在一定浓度的氨基酸递质的混合标准液中, 灌流液和收集方法与 TMPP 的回收率收集相同, 测定探针对各物质的回收率。每次使用探针前, 均需测定透析量, 透析液体积准确的探针方可使用, 使用后, 用蒸馏水灌流探针后保存。本实验共用探针 6 支, 分别测定探针对 Asp、Glu、Gly、Tau、GABA 的回收率, 结果见表 2。

表 2 氨基酸微透析探针的体外回收率
Tab 2 Recovery of microdialysis probes on amino acid(n=6)

氨基酸	灌流液浓度/μg·mL ⁻¹	探针回收率/%
Asp	1.09	52.4±3.7
Glu	1.04	48.7±5.3
Gly	1.14	44.6±2.9
Tau	1.02	56.1±6.4
GABA	1.25	51.9±4.5

2.7.5 药效学指标的检测 取各时间点脑部微透析样品, 按“2.4”项下方法进行操作, 液相色谱进行测定, 以标准曲线方程计算脑部氨基酸的浓度, 测定结果显示氨基酸类神经递质中除 Gly 之外的其他 4 个指标均与模型组在变化趋势上有统计学差异。将各组药效学指标对时间作图, 结果见图 2。

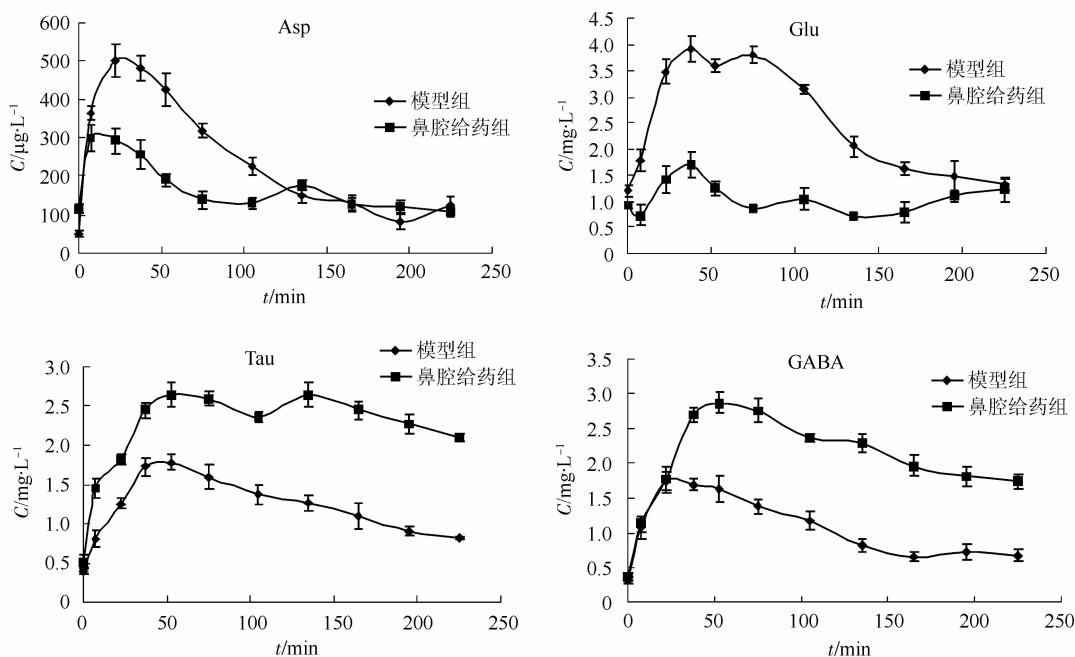


图2 模型组和鼻腔给药组的微透析样品中 Asp、Glu、Tau、GABA 的药-时曲线图

Fig 2 Concentration-time curves of Asp, Glu, Tau, GABA in microdialysis sample of treatment group and blank model group

3 讨论

3.1 关于 TMPP 鼻用 pH 敏感型原位凝胶^[8]

原位凝胶具有与用药部位特别是黏膜组织亲和力强、滞留时间长、良好的控制释药性能等优点,可分为温度、离子强度或 pH 敏感等类型。鼻腔的生理特点显示:鼻黏膜在解剖生理上与脑部存在独特的天然联系,可使药物通过鼻腔给药避开血脑屏障直接靶向于中枢神经系统,显著提高药物在脑组织中的分布和药物的治疗效率。此外,鼻黏液一般呈弱酸性,且由于鼻黏膜表面纤毛及鼻黏液的作用,致使常规溶液在鼻黏膜表面的滞留时间很短。所以本课题组研制了 TMPP 鼻用 pH 敏感型原位凝胶。

3.2 HPLC-FD 检测方法的确定

本实验采用微透析取样方法收集急性脑缺血模型大鼠脑内的氨基酸神经递质,采样量少,要求建立一种快速、精确的微量氨基酸定量分析方法。高效液相-荧光检测器色谱法具有分离时间短、分离度好的优点,本实验以邻苯二甲醛为柱前衍生剂,建立起一种简便、灵敏的氨基酸在线衍生方法,试验表明,本方法适用于检测微透析样品中微量氨基酸的含量。

3.3 氨基酸探针体外回收率测定的意义

探针的回收率是将微透析技术应用于 PK、PD、PK/PD 研究的一个关键问题,其大小受探针

的性质(如有效膜的长度、膜孔大小等)、待测物的性质(脂溶性、蛋白结合率、分子大小等)、灌流液的组成(亲脂性、pH 值等)、流速等诸多因素的影响。因此在微透析技术的应用中,对所研究的物质进行体外、体内回收率研究是非常必要的。但氨基酸类神经递质是一类内源性物质,在进行动物体内研究时,无法测定其体内回收率。另外,由于体内环境的复杂性,不同物质的体外回收率与体内回收率不一定相等,所以本课题测定氨基酸体外回收率不能代替其体内回收率的使用,只作为探针是否能重复利用的参考。

3.4 氨基酸类神经递质的选择和实验结论

Asp、Glu、Gly、Tau 和 GABA 是中枢神经系统重要的递质。Asp、Glu 为兴奋性氨基酸, Gly、Tau、GABA 为抑制性氨基酸。脑缺血常导致神经元损伤,脑缺血时,缺血神经元释放的大量兴奋性氨基酸在学习与记忆、神经元损伤等生理和病理生理过程中起着关键作用^[9-10];而 Gly、Tau、GABA 在中枢神经系统主要起抑制性作用,如在脑缺血过程中,大脑中的 GABA 功能有所下降,这在如惊厥发作的短时间内,有神经保护作用^[11]。所以选择氨基酸类神经递质作为药效学检测指标。

实验结果表明,给药后的模型大鼠体内的 Glu 和 Asp 与模型对照组相比显著下降,而 Tau 和 GABA 的量却有所增加,证明 TMPP 能明显降低

模型大鼠脑内兴奋性氨基酸的含量,增加脑内抑制性氨基酸的含量,对急性脑缺血模型大鼠起到保护作用。党红梅等^[12]的实验结果也表明,脑缺血时,使用盐酸川芎嗪注射液可显著降低细胞外兴奋性氨基酸神经递质,同时可显著升高抑制性氨基酸神经递质。这一结果将对阐明川芎嗪治疗缺血性脑血管疾病的有关机理提供帮助。

REFERENCES

- [1] GUO L J. GABA receptors and the cerebral ischemia [J]. J Xianning Coll (Med Sci)(咸宁学院学报:医学版), 2004, 18(2): 77-80.
- [2] YUAN F, CHEN Z J, CHEN J. Determination of tetramethylpyrazine and its active metabolite in rat plasma by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药), 2012, 29(6): 529-534.
- [3] MENG Q N. Treatment of acute cerebral infarction with ligustrazine injection and reinforced Buyan Huanwu tang of 38 cases [J]. Chin J Integr Tradit West Med Intens Crit Care(中西医结合实用临床急救), 1999, 6(1): 12.
- [4] ZHANG Z H, YU S Z. Effects of ligustrazine on polymorphonuclear leukocyte in focal cerebral ischemia cases [J]. Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med(浙江中西医结合杂志), 2002, 12(3): 154-156.
- [5] LIU H W, YAN Y L, ZHOU L L. Comparison of the brain pharmacokinetics of nasal tetramethylpyrazine phosphate pH-sensitive in situ gel in normal rats and model rats [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2012, 47 (5): 677-679.
- [6] ZHUGE Q C. Rats Radiostereostatics Mapping(大鼠脑立体定位图谱) [M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 3, 82.
- [7] ZEA LONGA, WEISTEIN P R, CALSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [8] LIU H W, YAN Y L, ZHOU L L. Prescription optimization of ligustrazine phosphate pH-sensitive in situ gel in nasal [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2010, 21(9): 2296-2298.
- [9] DAWSON L A, DJALI S, GONZALES C, et al. Haracterization of transient focal ischemia-induced in creases in extracellular glutamate and aspartate in spontaneously hypertensive rats [J]. Brain Res Bull, 2000, 53(6): 767-776.
- [10] RAO V L, BOWEN K K, DEMPSEY R J. Transient focal cerebral ischemia down regulates glutamate transporters GLT-1 and EAAC1 expression in rat brain [J]. Neurochem Res, 2001, 26(5): 407-502.
- [11] KANG T C, PARK S K, HWANG I K, et al. Spatial and temporal alterations in the GABA shunt in the gerbil hippocampus following transient ischemia [J]. Brain Res, 2002, 94(1/2): 10-18.
- [12] DANG H M, MA W Y, HAN H W. Influence of ligustrazine on trace amino acid neurotransmitters in striatum of rats after transient focal cerebral ischemia by CZE-LIF [J]. Chem J Chin Univ(高等学校化学学报), 2005, 26(10): 1803-1807.

收稿日期: 2012-11-14

大黄素国家级纯度有证标准物质研制

杨德智, 郭永辉, 张丽, 杨世颖, 吕扬^{*}(北京协和医学院 & 中国医学科学院药物研究所, 药物晶型研究中心, 晶型药物研究北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要: 目的 通过建立准确的定值分析方法及不确定度的研究, 研制具有可溯源性、高准确度量值的大黄素国家级化学纯度有证标准物质。方法 根据我国计量法和一级标准物质研制技术规范与相关技术文件要求, 采用高效液相色谱法(HPLC)和差示扫描量热法(DSC)对大黄素纯度标准物质联合定值, 并完成不确定度评估。结果 研制的大黄素纯度标准物质符合国家一级有证标准物质要求, 其化学纯度标准值与不确定度值为 $(99.54 \pm 0.18)\%$ ($k=2, P=0.95$)。结论 本实验研制的大黄素国家一级纯度有证标准物质具有量值准确、可溯源的特性, 属于国际公认的标准物质, 将为我国药品的有效物质和成分标准化与国际化, 提供必要的标准物质与物质标准。

关键词: 大黄素; 纯度标准物质; 高效液相色谱法; 差示扫描量热法; 标准值; 不确定度

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)09-0933-08

Development of National Primary Purity Certified Reference Material of Emodin

YANG Dezhi, GUO Yonghui, ZHANG Li, YANG Shiying, LÜ Yang^{*}(Research Center for Pharmaceutical Polymorphism, Peking Union Medical College, Institute of Materia Medica & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing

基金项目: 科技部科技基础性工作专项重点项目(2007FY130100); 天然药物活性物质与功能国家重点实验室自主课题 C 类-探索性课题 (GTZC201229)

作者简介: 杨德智, 男, 硕士, 助理研究员 Tel: (010)63030566 E-mail: ydz@imm.ac.cn ^{*}通信作者: 吕扬, 女, 博导, 研究员 Tel: (010)63161258 E-mail: luy@imm.ac.cn