

微量透析法——活體生物內藥物分析之新取樣技術

陳念賢 賴宇俊 *陳介甫 潘懷宗

國立陽明大學生命科學院藥理學研究所

*國立中國醫藥研究所

摘 要

本實驗採用微量透析技術(microdialysis)配合高效液相層析儀,偵測在靜脈投予不同劑量的古柯鹼(1.5 mg/kg, 3.0 mg/kg)之後,大白鼠內前額皮質區(mPFC)中古柯鹼及多巴胺的濃度變化情形。其結果發現:在靜脈投予古柯鹼前透析液中多巴胺濃度為 0.39 ± 0.06 nM;在投予古柯鹼之後不論高劑量組或低劑量組,二組的透析液中古柯鹼及多巴胺濃度均在二十分鐘內上升至最高,然後兩者相對應迅速下降,約一百分鐘後恢復到正常值。多巴胺上升最高百分比分別為劑量組的 $118.7 \pm 15.0\%$ 及高劑量組的 $214.1 \pm 20.3\%$;古柯鹼最高濃度則分別為 0.20 ± 0.08 μ M及 0.60 ± 0.08 μ M。由於古柯鹼的體內回收率為 $33 \pm 5\%$,因此可以推算出實驗動物mPFC處實際古柯鹼最高濃度分別為 1.84 ± 0.61 及 4.00 ± 0.94 μ M。總括而言,靜脈投予古柯鹼可引起mPFC多巴胺濃度上升,並呈劑量相關性,且mPFC處古柯鹼濃度與多巴胺濃度上升百分比成一次方線性關,其相關係數為0.976。從此一應用實例中,我們知道微量透析技術不僅可以偵測活體動物內特定區域中的藥物濃度,並可以同時獲得內生性物質的變化情形,是值得推廣之藥物分析技術。

前 言

藥物濫用問題在台灣是個愈來愈嚴重的問題,從早期的紅中、白板到今日的安非他命、海洛英;藥物的種類隨著時代的演進一再變換,雖然古柯鹼在國內並不是最普遍的濫用藥物,但觀其在歐美的風行程度,古柯鹼可能也會於不久的將來在台灣大行其道。有鑑於此,本實驗室自二年前即開始以古柯鹼為研究對象,配合活體微量透析法以及高效液相層析儀,探討古柯鹼在實驗動物內的中樞神經作用機轉。

古柯鹼的藥理作用有二:局部麻醉作用及中樞神經系統興奮作用。古柯鹼局部投予時,能改變神經細胞軸突部分細胞膜對鈉離子的通透性,而抑制感覺細胞神經衝動,造成局部麻醉。在中樞神經系統作用方面,是因為古柯鹼會在單胺類神經(monoaminergic nerve)末梢阻斷正腎上腺素(no-

repinephrine)、多巴胺(dopamine)、及血清張力素(serotonine)的再回收(reuptake)機轉,因而加強此類神經傳導物質與接受器結合作用的機會,產生強烈中樞神經系統興奮作用。雖然古柯鹼可阻斷多種神經傳導物質的再回收機轉,達到中樞神經系統興奮作用,但古柯鹼所引起的欣快感卻是古柯鹼阻斷腦中多巴胺的再回收有強烈的相關性^(1,2),因此本研究報告重要集中在多巴胺系統的探討上面。

腦中多巴胺的分佈主要有四個路徑:黑質網狀體系統(nigrostriatal system)、中邊緣系統(meso- limbic system)、中皮質系統(mesocortical system)、及結節漏斗系統(tuberoinfundibular system)。其中中邊緣中皮質系統就是目前所認為與引起欣快感最有關連的系統,統稱中皮質邊緣系統(meso- corticolimbic system)這可能就是腦中產生快樂、興奮的路徑。中邊緣系統細胞的起源在ventral tegmental area (A10),經由medial forebrain bundle 投射至 nucleus accumbens、olfactory tube-

rcle、amygdala及septal nucleus。中皮質系統亦源始於中腦A10的地方，投射到皮質各區如cingulate gyrus、entorhinal cortex及prefrontal cortex。雖然大家接受古柯鹼會作用在中皮質系統，但以往大部分的研究都較偏重於中邊緣系統^(3,4,5)；或是單獨探討古柯鹼於中皮質系統引起多巴胺濃度上升情形而忽略古柯鹼本身在中皮質系統的作用濃度^(6,7)。雖然瞭解古柯鹼引發多巴胺濃度的改變很重要，但明瞭引起多巴胺濃度改變時相對應的古柯鹼濃度亦不可忽略，另外瞭解靜脈投予古柯鹼與其所引起腦中內前額皮質區(medial prefrontal cortex; mPFC)多巴胺濃度上升間是否有劑量相關性也是值得探討的問題。由於此一動機，我們希望探討mPFC古柯鹼濃度與其引起之多巴胺濃度改變情形是否有劑量相關性。

雖然想測得動物腦中古柯鹼及多巴胺的濃度，但若無適當的取樣技術、分析方法、一切都是空談。微量透析法是本實驗所採用的一個新的活體取樣技術，比起已往常用的抽血法或組織切片法，微量透析法有相當多的優點。抽血法是較簡便的方法，但無法獲知某一器官或區域中之濃度；組織切片法雖然已經限定了欲測物質的取樣區域，但它卻無法區別該區域細胞外液及細胞內液的物質濃度，且處理過程較繁瑣⁽⁸⁾。除此之外，若要用組織切片法測得某物質於動物體內相對於時間的變化情形，則須於各時間點犧牲實驗動物，取得切片，分析欲測物質濃度。此種作法對於實驗動物的需求便相當驚人。本實驗所採用的微量透析法在國內仍是一個相當新穎的活體取樣技術，此法不但可偵測微量物質在動物體內的變化，同時也可補抽血檢查法及組織切片法的不足。

微量透析法並不僅用於藥物分析，它更可運用在神經科學、食品營養分析、能量代謝等等領域。它的運用部位相當廣泛，例如：中樞神經系統的腦及脊髓、肝臟、脂肪組織、眼睛、肌肉等部位，也有學者將其運用於蔬果上⁽⁹⁾。微量透析技術配合高效液相層析儀/電化學偵測系統(High Performance Liquid Chromatography/Electrochemical Detector; HPLC/ECD)，可偵測胺基酸、葡萄糖、乙醯膽鹼(Acetylcholine)及生物胺(Biogenic amines)；而配合高效液相層析儀/紫外光偵測系統(High Performance Liquid Chromatography/Ultraviolet; HPLC/UV)則可用於乳酸鹽、焦葡萄糖鹽、嘌呤及大部份藥物的偵測；利用微量透析技術配合HPLC/ECD及HPLC/UV則可同時將某一區域藥物對生物胺的變化情形及藥物動力學加以研究⁽⁹⁾，實在是值得

推廣的活體取樣技術。

微量透析法的工具主要是微量透析探針(Probe)，它是由二根微小矽管加上在二矽管前端的半透膜組合而成。此探針可靈活的植入動物被監測部位，亦即我們有興趣探討物質變化的部位，而後由進口矽管通入不含欲測物質的液體稱為推進液(Perfusate)，當推進液經過小矽管到達半透膜時，由於濃度梯度的關係，欲測物質會自動的由高濃度處(半透膜外)向低濃度處(半透膜內)滲透，最後將在出口矽管蒐集到推進液及欲測物質的混合物稱為透析液(Dialysate)。經由分析透析液中欲測物質的濃度，即可推測該物質於該區域的濃度。

在以往分析所得的透析液中欲測物質的濃度，乘上由體外校正法求得的探針回收率(in vitro recovery)，即可得該物質於該區域的濃度。而目前體外校正法已分別於1992年及1994年由Justice及Pan等人改進為體內校正法(in vivo recovery)^(10,11,12)，由於體內校正法的發現使得採用微量透析法能更精確的推測欲測物質於欲測區域的濃度。

在以往的實驗報告中，大都是以透析液中古柯鹼的濃度來代表動物體內的實際濃度，雖然透析液中古柯鹼的濃度與動物體內的實際濃度間有一定的比例相關性，但終究不是真正動物體內的濃度，因此本實驗想探討：在不同劑量下，經由體內校正方法換算所得的實驗動物mPFC實際古柯鹼濃度為何，而此濃度和多巴胺的上升情形有無任何線性關係。

材料與方法

一、材料

(一)試藥

本實驗所使用的水合三氯乙醛(chloral hydrate)購自Riedel-deHaen Chinosol, Seelze；多巴胺(dopamine hydrochloride)及Sodium 1-octanesulfonate (SOS)購自美國Sigma公司；ascorbic acid、calcium chloride、ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt、glucose、magnesium chloride、potassium chloride、sodium acetate、sodium chloride、triethylamine則購自Nacalai, Tesque, Kyoto, Japan；acetonitrile、methanol、則是自愛爾蘭Lab-Scan購得。

(二)實驗動物

本實驗所使用之實驗動物為購自國立陽明大學動物中心之成熟、雄性大白鼠(Sprague-Dawley

rats),體重限制在250-350公克之間。

(三)液相層析測試條件

本次實驗設備可分為多巴胺濃度偵測及古柯鹼濃度偵測二個系統,多巴胺濃度偵測部分使用到的HPLC/ECD含購自ISCO公司的pump (Model 260D); Bioanalytical System公司的電化學偵測器(LC-4C)及Linear的記錄器(Model 1202);層析管柱為ODS Hypersil C₁₈ 5 μ m 100 $\times$ 2.1mm (Hewlett-Packard, # 799160D-552),工作電極是Bioanalytical System公司的玻璃碳電極(MF1000);氧化電位維持於0.75V;參考電極是Bioanalytical System公司的Ag/AgCl electrode (Model MW 2021);多巴胺滯留時間(retention time)為4.0分鐘;偵測極限為3.0pg。在分析條件方面移動相(mobile phase)組成成分含sodium dihydrogen phosphate 50mM sodium 1-octanesulfonate 2.6mM ethylenediaminetetraacetic acid disodium 0.27mM、triethylamine 5.0mM、methanol 15%、pH維持在5.75;流速是0.3ml/min。

在古柯鹼濃度偵測方面使用到的HPLC/UV含購自ISCO公司的pump (Model 100D); LDC Analytical公司的紫外光偵測器(model Spectromonitor 3200)以及Linear的記錄器(Model 1202);此時使用的層析管柱為自行填充的ODS Nucleosil C₁₈管柱5 μ m 150 $\times$ 2.0mm;此外在分析條件方面移動相組成成分sodium dihydrogen phosphate 50mM、triethylamine 5.0mM、acetonitrile 17%、methanol 10%、pH維持在5.6,流速為0.5 ml/min;古柯鹼的滯留時間為7.9分鐘;偵測極限則為6.1ng。

(四)探針

本實驗所採用為實驗室自行製造的探針,其薄膜材質是從美國Spectrum Medical Industries Inc.公司購得內徑150 μ m,外徑220 μ m,分子量的通透上限(cut off)為6000道爾吞的半透膜。微量透析探針進出口管線的材質是從美國Polymicro Technologies Inc.公司取得外徑100 μ m,內徑40 μ m的fused silica tubing,活性薄膜長度(active length)為4mm。實驗時,探針進口端接上1.0ml針筒(Hamilton Model 1001),針筒內裝有人工腦脊髓液(artificial cerebrospinal fluid,簡稱aCSF,組成成分為sodium chloride 149mM; potassium chloride 2.8mM; calcium chloride 1.2mM; magnesium chloride 1.2mM; ascorbic acid 0.25mM; D (一)glucose 5.4mM;pH值控制在7.2~7.4之間)當做推進液(perfusate)經微量注射幫浦(Harvard

model 55-3206)以透析率1.2 μ l/min,將人工腦脊髓液輸入微量透析探針,另以700 μ l的eppendorf tube在探針出口端收集透析液(dialysate)。

二、方法

(一)基本手術處理

實驗動物先以腹腔注射水合三氯乙醛(chloral hydrate) 400 mg/kg麻醉後,再以靜脈給藥方式(intravenous administration),每個小時補充水合三氯乙醛80 mg/kg,藉以維持動物適當麻醉的情形以便進行實驗。

首先,在實驗動物施予氣管插管手術,以維持實驗動物呼吸暢通。同時在右側股靜脈(femoral vein)施予插管手術,以便由靜脈補充麻醉劑。

經過上述手術處理之後,將實驗動物頭部固定於立體定位儀(Kopf Model 900)上,參考Paxinos及Watson大白鼠腦部圖譜以前囟(bregma)為基準點,向前3.1mm,向右0.8mm,利用鑽孔器在頭蓋骨上鑽孔,以自製微量透析探針(home-made microdialysis probe)置入頭蓋骨以下6.0mm深度,此時微量透析探針的active membrane area剛好落在mPFC所在的區域內。

(二)實驗步驟流程

實驗可分為二大部分,首先為多巴胺濃度的測量:將微量透析探針置入內前額皮質區平衡二個小時之後,每隔二十分鐘收集一次透析液。將此透析液注射入HPLC/ECD,分析透析液中多巴胺濃度,直到連續三次分析所得的透析液中多巴胺濃度大致相同後經由靜脈投予古柯鹼(3.0 mg/kg或1.5 mg/kg),然後每隔二十分鐘收集一次透析液,連續收集五次透析液(給藥後共100分鐘)。同樣的將此透析液注射入HPLC/ECD,分析透析液中多巴胺濃度變化情形。最後將多巴胺標準品溶液(1nM, 5 nM, 10nM)注射入HPLC/ECD做濃度對波峰高度的校正曲線,以求出透析液中多巴胺之濃度。

第二部分為古柯鹼濃度測量:將微量透析探針置入內前額皮質區平衡二個小時之後,經由靜脈投予古柯鹼(3.0 mg/kg或1.5 mg/kg),然後每隔二十分鐘收集一次透析液,連續收集五次透析液,將此透析液注射入HPLC/UV,分析透析液中古柯鹼濃度變化情形,最後將古柯鹼標準品溶液(0.1mM, 0.5mM, 1mM)同樣的注射入HPLC/UV做濃度對波峰高度的校正曲線,以求出透析液中古柯鹼之濃度。最後再依Pan等人於1994年發表的方法^(1,2)進行古柯鹼之體內校正實驗,以求得古柯鹼在實驗動物mPFC的實際濃度。

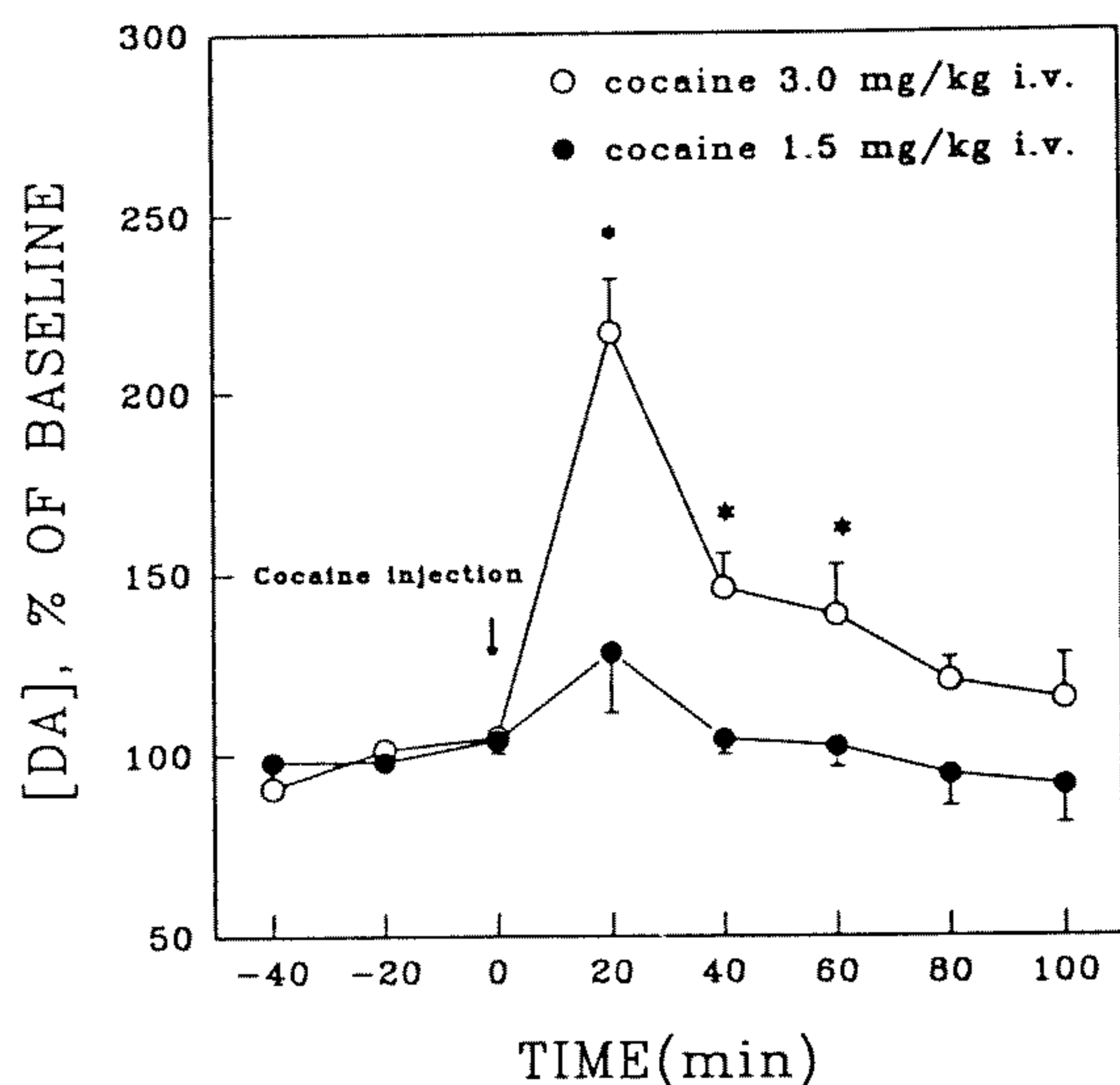


Figure 1. Time-course detection of DA concentration in the dialysate of the mPFC following a single cocaine injection (i.v.): 1.5 mg/kg in group A and 3.0 mg/kg in group B. Values are the percentile of baseline at 20-min intervals and are mean $\pm$ S.E.M. of both groups. * $p < 0.05$, as compared group A with group B.

(三)組織切片確認

實驗結束後，將實驗動物腦組織取出，以生理食鹽水沖洗血跡後，浸泡於含有10%福馬林(formaldehyde)及30%蔗糖(sucrose)之生理食鹽水中固定，固定後經冷凍切片(-11°C, 25mm)，以1% Netral red染色後之腦組織切片放在顯微鏡下檢視實際微量透析探針的active membrane area位置是否真的位於mPFC內。

結果與討論

實驗數據均以平均值 $\pm$ 平均標準誤差 (mean $\pm$ standard error of mean) 表示。先以 two way analysis of variance (ANOVA) with repeated measurement 分析組別間是否有顯著的差異，再以 Scheffe's multiple range test 判斷各時間點差異。以 $p < 0.05$ 為具有明顯統計意義。

本實驗的結果可分為三部分：在多巴胺濃度測量部分，由於此次實驗並未求得動物體內實際多巴胺的濃度，因此以投予古柯鹼前連續三次HPLC/ECD記錄之波峰高度的平均值為基準，當作基線

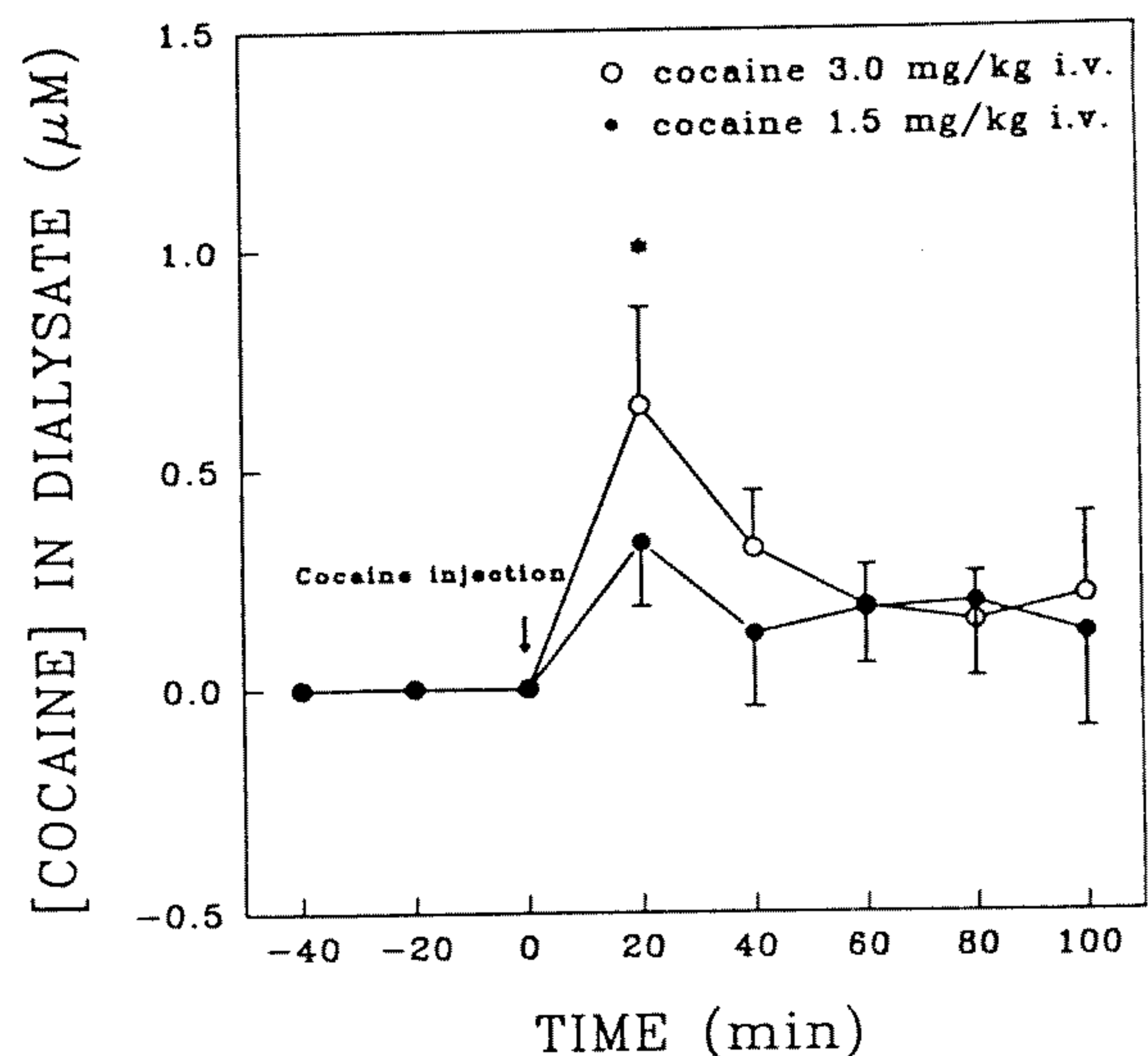


Figure 2. Time-course detection of actual extracellular cocaine concentration in the mPFC following a single cocaine injection (i.v.): 1.5 mg/kg in group A and 3.0 mg/kg in group B. Values are the average of cocaine concentration of each 20-min sampling period and are mean $\pm$ S.E.M. of groups. * $p < 0.05$, as compared group A with group B.

濃度(baseline concentration)投予古柯鹼之後每個波峰高度均與此值比較，換算為百分比，以此法來評估多巴胺的濃度改變情形。經由上述計算，投予古柯鹼 3.0 mg/kg 組多巴胺濃度上升達 $214.1 \pm 20.3\%$ ；但投予 1.5 mg/kg 組僅上升至 $118.7 \pm 15.0\%$ ，二者間有統計上的差異(如圖一)。此外在投予古柯鹼之前二組透析液中多巴胺濃度相近，且無統計上的差別，平均值為 0.39 ± 0.06 nM。

在古柯鹼濃度測量部分，在靜脈給予古柯鹼後二組實驗動物mPFC處均可測得古柯鹼的存在，且在20分鐘內二組濃度上升至最高並呈劑量相關性。若僅分析透析液中古柯鹼的濃度，在靜脈投予古柯鹼 1.5 mg/kg 組為 0.20 ± 0.08 μ M，但在靜脈投予古柯鹼 3.0 mg/kg 組則為 0.60 ± 0.08 μ M，二者間有統計上的差異(如圖二)。若經換算為實驗動物mPFC處實際古柯鹼濃度，由於體內回收率 $33 \pm 5\%$ ，因此實驗動物mPFC處實際古柯鹼濃度可分別為 1.84 ± 0.61 μ M 及 4.00 ± 0.94 μ M(如圖三)。

第三部分為實驗動物mPFC古柯鹼的實驗濃度與多巴胺濃度上升百分比相關性探討。經由上述古柯鹼的實際濃度與多巴胺濃度上升百分比的測

量可依此二組數據作圖(如圖四),並劃出一條線性迴歸線,此迴歸線的相關係數為0.976,斜率為27,截距為100.28;表示在實驗動物mPFC古柯鹼濃度於0-4 μM 之間時與巴胺濃度上升百分比成一次方正比關係。此外尚可比較依方程式計算出的多巴胺濃度上升百分比與實際多巴胺濃度上升百分比間差異性有多少,其平均誤差(相對於實驗值)僅為9.4%,顯示其估計的準確性。

查證以往的文獻,由週邊投予古柯鹼會引起中樞多巴胺濃度上升時,且在Striatum及Nucleus Accumbens等處上升程度大於mPFC^(3,4,5),這可能是因為在Striatum, Nucleus Accumbens多巴胺類神經末梢的密度較mPFC為高。本次實驗測量在投予不同濃度古柯鹼後引起mPFC處多巴胺濃度升高方面,結果與Luoh於1994年所報告的結果相近,在靜脈投予古柯鹼3.0 mg/kg後mPFC透析液中多巴胺的濃度上升到二倍。1989年Moghaddam等人分別在以chloral hydrate麻醉大白鼠靜脈投予古柯鹼1.0 mg/kg; 2.0 mg/kg,投予前後也是每20分鐘分析一次透析液,探討大白鼠mPFC處多巴胺濃度改變情形,其結果發現在mPFC方面,僅投予古

柯鹼1.0 mg/kg並不影響多巴胺的濃度,而投予古柯鹼2.0 mg/kg時,多巴胺的濃度上升至306%⁽⁵⁾。比較Moghaddam所做的與本次實驗之結果,雖然二者多巴胺上升幅度不完全相同但同樣都表達了靜脈投予古柯鹼的濃度與其所引起的mPFC濃度上升有劑量相關性。

若探討投予古柯鹼前mPFC透析液中多巴胺的基線濃度,本次實驗之結果與Moghaddam於1989年所測得的多巴胺透析液濃度($0.4 \pm 0.1 \text{ nM}$)相仿⁽⁵⁾。此外,1994年Luoh等人分別在大白鼠靜脈投與二種不同濃度古柯鹼(1.5 mg/kg及3.0 mg/kg)後,每八分鐘以HPLC/UV分析透析液中古柯鹼濃度,其十六分鐘內分別測得二次古柯鹼的濃度,我們將其平均後,分別為0.35 μM 及0.70 μM ⁽⁶⁾,均與本實驗所測之濃度相仿。可惜的是Moghaddam並未在他的實驗中偵測古柯鹼的濃度,無法更進一步比較實驗結果;而Luoh等人僅測得靜脈投予古柯鹼3.0 mg/kg後多巴胺濃度上升情形,沒有再測量靜脈投予古柯鹼1.5 mg/kg後,多巴胺濃度上升情形,因此無法對二者間是否有劑量相關性加以探討,而本實驗則對此做了完整的探討。

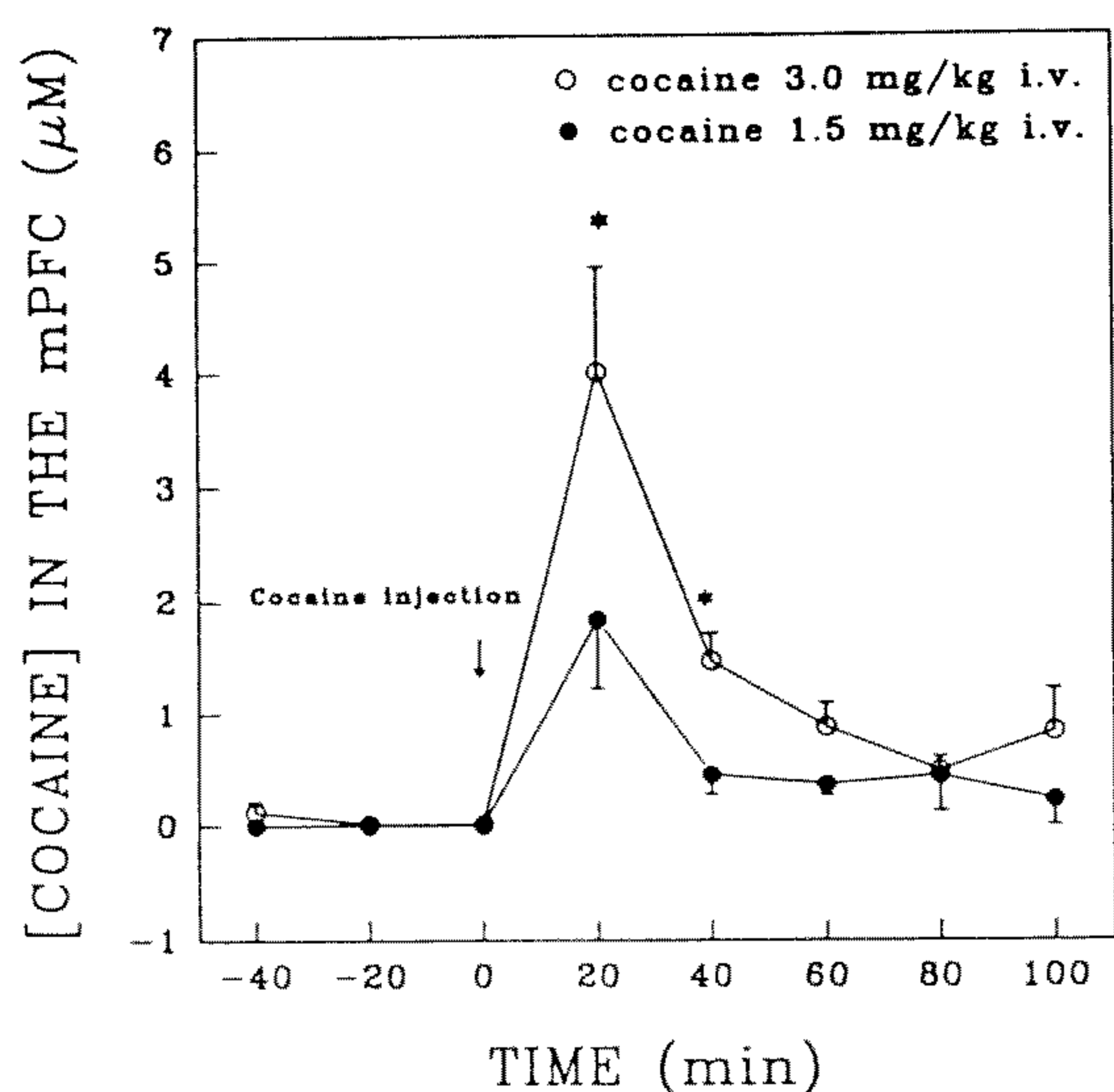


Figure 3. Time-course detection of actual extracellular cocaine concentration in the mPFC following a single cocaine injection (i.v.): 1.5 mg/kg in group A and 3.0 mg/kg in group B. Values are corrected for cocaine in vivo recovery from the dialysate concentrations and are mean $\pm$ S.E.M. of groups. * $p < 0.05$, as compared group A with group B.

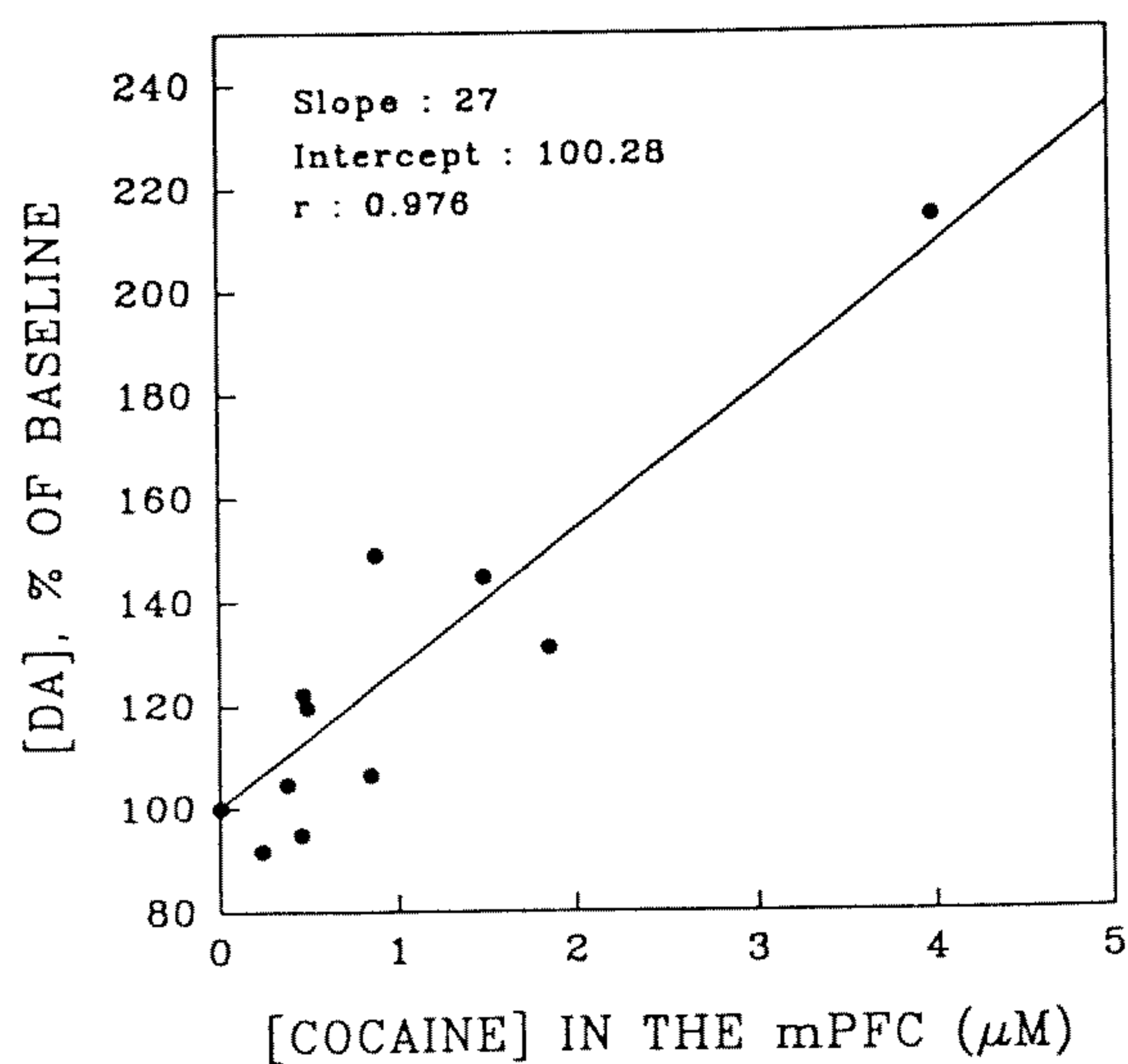


Figure 4. A first-order linear regression line of percentile increase of extracellular DA versus extracellular cocaine concentration in the mPFC. The line has a slope of 27% DA increase at per μM cocaine and the correlation coefficient is 0.976.

由於mPFC古柯鹼的實際濃度與多巴胺濃度上升百分比線性迴歸圖的完成,表示當在實驗動物mPFC測得古柯鹼的實際濃度在0-4 μ M之間均可用內插法求得此時多巴胺濃度上升百分比,同理若在靜脈甚至腹腔投予古柯鹼之後的mPFC多巴胺濃度上升百分比在100%-220%之間亦可用內插法求得此時mPFC古柯鹼的濃度,其應用價值很大。

針對本實驗而言,微量透析法合併HPLC/ECD、HPLC/UV對於瞭解實驗動物mPFC古柯鹼與多巴胺濃度變化有相當大的助益;也由於本實驗的完成,再一次證實微量透析技術在食品藥物分析或活體動物實驗等方面仍有相當大的發展。

誌 謝

本研究承蒙中國醫藥研究所經費補助(計畫編號NRICM-81021),僅致謝忱。

參考文獻

1. Galloway, M.P. 1988. Neurochemical Interaction of Cocaine with Dopaminergic System. *Trends Pharmacol. Sci.* 9 : 451-454.
2. Bozarth, M.A. 1989. New Perspectives on Cocaine Addiction: Recent Findings from Animal Research. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67 : 1158-1167.
3. Hurd, Y.L. and Ungerstedt, U. 1989. Cocaine: An in Vivo Microdialysis Evaluation of its Acute Action on Dopamine Transmission in Rat Striatum. *Synapse.* 3 : 48-54.
4. Broderick, P.A. 1992. Distinguishing Effects of Cocaine IV and Sc on Mesoaccumbens Dopamine and Serotonin Release with Chloral Hydrate Anesthesia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43 : 929-937.
5. Moghaddam, B. and Bunney, B.S. 1989. Differential Effect of Cocaine on Extracellular Dopamine Levels in Rat Medial Prefrontal Cortex and Nucleus Accumbens: Comparison to Amphetamine. *Synapse.* 4 : 156-161.
6. Luoh, H.F., Kuo, T.B.J., Chan, S.H.H. and Pan, W.H.T. 1994. Power Spectral Analysis of Electroencephalographic Desynchronization Induced by Cocaine in Rats: Correlation with Microdialysis Evaluation of Dopaminergic Neurotransmission at the Medial Prefrontal Cortex. *Synapse.* 16 : 29-33.
7. Pan, W.H.T., Chen, N.H., Lai, Y.J. and Luoh, H.F. 1994. Differential Effects of Chloral Hydrate and Pentobarbital Sodium on Cocaine-Induced Electroencephalographic Desynchronization at the Medial Prefrontal Cortex in Rat. *Life Sci.* 54 : 419-424.
8. Robinson, T.E. and Justice, J.B. Jr. 1991. Microdialysis in the Neuroscience. pp. 3-22. Elsevier Press. New York.
9. Lunte, C.E. and Scott, D.O. 1991. Sampling Living Systems Using Microdialysis Probes. *Anal. Chem.* 63 : 773A-780A.
10. Nicolaysen, L.C., Pan, W.H.T. and Justice, J. B., Jr. 1988. Extracellular Cocaine and Dopamine Concentrations Are Linearly Related in Rat Striatum. *Brain Res.* 456 : 317-323.
11. Menacherry, S, Hubert, W. and Justice, J.B., Jr. 1992. In vivo Calibration of Microdialysis Probes for Exogenous Compounds. *Anal. Chem.* 64 : 577-583.
12. Pan, W.H.T., Lim, L.H. and Shiau, M.R. 1994. Differences in Extracellular Cocaine Concentration between the Ventral Tegmental Area and the Medial Prefrontal Cortex Following Intravenous Administration as Revealed by Quantitative Microdialysis Coupled with in Vivo Calibration. *J. Neurosci. Methods.* 53:65-71.

In Vivo Microdialysis : A Novel Sampling Technique for Drug Analysis in Live Subjects

NIEN-HSIEN CHEN, YU-JUN LAI, *CHIEH-FU CHEN AND WYNN HT PAN

Institute of Pharmacology, National Yang-Ming University, Shih-Pai, Taipei 11221, Taiwan, R.O.C.

**National Research Institute of Chinese Medicine, Shin-Dian, Taipei Hsien 23177, Taiwan, R.O.C*

ABSTRACT

By using an in vivo microdialysis technique, extracellular dopamine (DA) and cocaine concentration in the medial prefrontal cortex (mPFC) after intravenous cocaine injection (1.5 mg/kg in group A and 3.0 mg/kg in group B) were evaluated in adult male Sprague-Dawley rats anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, i.p., with 80 mg/kg/h supplements). Dialysate samples were collected at 20-min intervals for a 100-min period and were analyzed for DA content by an HPLC/electrochemical detector, and for cocaine content by an HPLC/ultraviolet detector. After intravenous (i.v.) cocaine injection, both DA and cocaine concentrations in the dialysate reached maximum within 20 minutes, correlated nicely, and then rapidly declined. The maximal DA increase was $214.0 \pm 20.3\%$ for the high dose group and $118.7 \pm 5.0\%$ for the low dose group. The DA baseline concentration in dialysate was $0.390 \pm 0.058 \text{ nM}$. The maximal cocaine concentration was $0.20 \pm 0.08 \mu\text{M}$, and

$0.6 \pm 0.08 \mu\text{M}$ respectively. By using an in vivo calibration method for microdialysis, the in vivo recovery of cocaine in the mPFC was obtained as $33 \pm 5\%$. The actual extracellular cocaine concentration was therefore calculated to be $1.84 \pm 0.64 \mu\text{M}$ in group A and $4.00 \pm 0.94 \mu\text{M}$ in group B. From the results, extracellular cocaine concentration was found to be highly correlated with a DA percentile increase over the 100 min period of time. After first-order linear regression, the correlation coefficient was 0.976. In summary, in vivo microdialysis is not only a sampling technique for determining the drug concentration at a specific area in live subjects, but is also useful simultaneously to observe the changes of endogenous compounds. Therefore, microdialysis technique is a popular research tool with great potential in the immediate future and is a valuable new state of the art to be introduced into our research society.

Key words: Cocaine, Dopamine, Medial Prefrontal Cortex, In Vivo Recovery.

