

代谢分析

毛细管电泳法快速测定大鼠血浆中丙吡胺游离药物和总药物浓度及血浆蛋白结合率*

胡小波, 刘燕萌, 武瑞君, 胡新, 鄢尤奇, 凌笑梅**

(北京大学药学院药物分析教研室, 北京 100191)

摘要 目的: 建立一个全新、简单、快速的高效毛细管电泳方法, 不需要对血浆样品进行任何前处理, 血浆样品直接进样测定丙吡胺在大鼠血浆中的游离药物浓度和总药物浓度及血浆蛋白结合率。方法: 采用 40.2 cm 未涂层石英毛细管 (75 μm $\times$ 375 μm , 有效长度 30 cm), 分别以 pH 7.4 的 20 mmol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸盐缓冲溶液和含有 50 mmol $\cdot$ L⁻¹ 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 的 20 mmol $\cdot$ L⁻¹ 磷酸盐缓冲溶液作为缓冲体系, 测定游离药物浓度和总药物浓度。采用 3.447 kPa 压力直接进血浆样品 5 s, 分离电压 15 kV, 温度 20 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 190 nm。结果: 方法的专属性强, 在线测定血浆中总药物浓度时, 丙吡胺与蛋白的结合得到充分破坏并与血浆蛋白成分在 5 min 内达到基线分离, 丙吡胺在血浆中总质量浓度分别在 1.0~20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 20.0~200.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的低、高浓度区间内呈现良好的线性关系, 相关系数分别为 0.999 2 和 0.997 7, 回收率为 93.8%~110.7%。在体外血浆生物样品中, 当预温孵的丙吡胺质量浓度为 100、50、25、12.5、10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 血浆蛋白结合率平均值为 86.7%、86.3%、86.4%、78.3%、74.7%。在体内血浆生物样品中, 丙吡胺血浆蛋白结合率平均值范围在 39.3%~91.5%。测定结果表明丙吡胺与大鼠血浆蛋白的结合具有一强、一弱 2 个结合位点, 结合常数分别为 $5.3 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 和 $1.2 \times 10^2 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 。绘制了大鼠在给药后 24 h 体内丙吡胺游离和总药物浓度的药时曲线。结论: 利用所建立的新方法, 将含丙吡胺的血浆生物样品直接进样, 高效、快速地测定了大鼠体内外血浆生物样品中丙吡胺的游离药物和总药物浓度。新建的方法灵敏, 高效快速, 操作简单, 耗样量少, 价廉, 有潜在的广泛的应用价值。

关键词: 丙吡胺; 血浆蛋白结合率; 结合常数; 游离药物浓度药时曲线; 总药物浓度药时曲线; 毛细管区带电泳 (CZE)

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2018) 07-1174-09

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.07.11

A novel, fast method to determine free and total drug concentrations and plasma protein-binding rate of disopyramide in rat plasma by capillary electrophoresis*

HU Xiao-bo, LIU Yan-meng, WU Rui-jun, HU Xin, YAN You-qi, LING Xiao-mei**

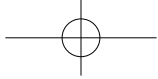
(Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract Objective: To establish a novel and fast high-performance capillary electrophoresis method for the determination of free and total drug concentrations of disopyramide in rat plasma *in vivo* and *in vitro* without any

* 国家自然科学基金项目 (81673392 和 81373372)

** 通信作者 Tel: (010) 82801590; E-mail: lngxm@bjmu.edu.cn

第一作者 Tel: 18600672094; E-mail: whosawbo@163.com



sample preparation process, and also to detect the plasma protein-binding rate. **Methods:** The separation column was 40.2 cm separation capillary (75 μm) with 15 kV separation voltage. The sample injection time was 5 s with the pressure of 3.447 kPa. 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ potassium phosphate buffer and 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ potassium phosphate buffer containing 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris were adopted for the determination of free drug concentrations and total drug concentrations, respectively. Both buffers' pH value were equal to 7.4. **Results:** Under online total drug concentration measurement condition, good linear relationships ($R_1^2=0.999\ 2$, $R_2^2=0.997\ 7$) were achieved within the concentration of 1.0–20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and 20.0–200.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The recoveries were 93.8%–110.7%. For the disopyramide precubation concentrations of 100, 50, 25, 12.5, 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ *in vitro*, the corresponding plasma protein binding rates (PPB) were 86.7%, 86.3%, 86.4%, 78.3%, 74.7%, respectively. The average plasma protein binding rate range was 39.3%–91.5% *in vivo*. Two binding sites could be found between disopyramide and rat plasma protein. The strong and weak bound sites' binding constants were $5.3 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ and $1.2 \times 10^2 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$, respectively. Lastly, the free and total drug concentration–time curves in 24 h were drawn.

Conclusion: The novel method was applied to detect the free and total drug concentrations of disopyramide in rat plasma *in vivo* and *in vitro*. The novel method is simple, fast, cheap, effective and has a prospect of being widely used.

Keywords: disopyramide; plasma protein binding rate; protein binding continents; free drug concentration–time curve; total drug concentration–time curve; capillary zone electrophoresis (CZE)

丙吡胺 (disopyramide), 别名达舒平、诺佩斯、异脉停、吡二丙胺、双异丙吡胺等, 为抗心律失常药, 常用其磷酸盐, 属于 I 类钠通道阻滞药。该药与血浆蛋白结合而引起非线性动力学, 是一种典型药物, 对药物蛋白结合作用的研究有着重要的临床价值^[1]。由于其血浆蛋白结合率范围很广, 个体差异较大, 治疗窗口较窄, 因此必须监测其游离药物浓度, 否则很可能因为游离药物浓度超过预期而产生毒性症状。目前, 已经有很多致力于研究药物和血浆蛋白的结合的方法被使用^[2], 例如平衡透析法^[3]、液液萃取法^[4]、超滤法^[5]、超离心法^[6]、高效前沿分析法^[7]、固相微萃取^[8]、云点萃取法^[9]等等, 但是这些方法各有其限制, 有的耗时长, 有的灵敏度不够, 有的样品处理复杂, 有的设备比较昂贵等。截止目前, 能够采用血浆样品直接进样, 不需要进行任何前处理, 并能同时测定血浆中丙吡胺游离浓度和总浓度的方法尚未见到相关报道。高效毛细管电泳 (high performance capillary electrophoresis, HPCE) 方法具有简便、准确、耗样量少, 分离度高等优点^[10]。本论文采用 HPCE 法作为载体, 使用血浆样品直接进样, 优化了实验条件, 测定了丙吡胺的游离和总药物浓度, 为简便、准确、快速测定药物血浆蛋白结合率、结合常数、游离药物浓度药时曲线和总药物浓度药时曲线提供了一种

具有重要参考意义的全新方法。相对于其他方法, 本方法具有一些突出优点: 首先在血浆生物样品上避免了复杂的前处理过程, 可以直接血浆进样, 操作十分简便; 其次是丙吡胺响应峰可以在 5 min 内与血浆蛋白实现基线分离, 测定耗时很短; 然后仅仅在线改变运行缓冲溶液就可以使用同一类方法同时测定丙吡胺的游离和总血药浓度, 简单高效, 是一种非常具有研究和应用价值的方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Beckman P/ACE™ MDQ 毛细管电泳仪 (Beckman 公司), 包括光二极管阵列检测器 (PDA), 32 Karat™ 数据处理工作站 5.0 版; TGL-16C 型离心机, 最高转速 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ (上海安亭科学仪器厂); 聚酰亚胺涂层包围的熔融石英毛细管 (内径 75 μm , 外径 375 μm , 有效长度 30 cm, 河北永年光纤厂); PXSJ-216 型离子分析仪 (上海雷磁仪器厂); KQ-250DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 丙吡胺纯度为 99.9% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); 三羟基甲基氨基甲烷 (Tris) 为分析纯 (北京鼎国昌盛生物技术有限公司); 双重蒸馏水使用 Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) 制备, 磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氢氧化钠等试

剂为分析纯(北京鼎国昌盛生物技术有限公司)。

2 溶液配制

2.1 缓冲溶液 精密称取磷酸二氢钾和磷酸氢二钾适量,分别用双蒸水配成浓度均为 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 A 液和 B 液,用 A 液调节 B 液直到 pH 为 7.4,得到 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液。再精密称取 Tris 适量,加入之前配制的 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液中,使 Tris 浓度为 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,充分搅拌溶解后,使用 A 液和 B 液调节至 pH 为 7.4,即得含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris 的 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液。以上溶液均 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,然后置冰箱内(4°C)保存。

2.2 丙吡胺储备液 精密称取丙吡胺适量,加磷酸盐缓冲溶液溶解,并定容于 10 mL 量瓶中,即得 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的丙吡胺储备液,置冰箱内(4°C)保存备用。

3 血浆样品采集

健康的雄性 SD 大鼠 5 只,体质量处于 $200\sim 250 \text{ g}$ 之间(6~8 周龄),II 级清洁动物,均采购自北京大学医学部实验动物科学部。在实验前先对大鼠进行适应性喂养 7 d,自由饮食和饮水。大鼠灌胃前禁食 12 h,仍然自由饮水。实验组大鼠用丙吡胺的生理盐水混悬液 1.5 mL (剂量: $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,涡旋混合)灌胃;对照组用生理盐水 1.5 mL 灌胃。大鼠灌胃后采血前禁食 12 h,自由饮水。经乙醚短暂麻醉后,分别在灌胃前及灌胃后 0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、6、8、12、24 h 眼眶取血。全血样品用肝素抗凝, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 在 4°C 离心 10 min 后得到了大鼠的空白血浆或血浆样品。空白血浆于 -20°C 下冷冻保存,解冻后 24 h 内使用;给药后的血浆样品除非用于反复冻融的稳定性测定,均即时进行分析测定。

4 电泳条件

样品使用 3.447 kPa 压力直接进样 5 s ,运行电压 15 kV ; 40.2 cm 未涂层熔融石英毛细管($75 \mu\text{m} \times 375 \mu\text{m}$,有效长度 30 cm),使用新的毛细管前需要进行活化处理(甲醇冲洗 10 min , $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液冲洗 30 min ,双蒸水和运行缓冲液各冲洗 10 min);样品室温度 4°C ,卡盒温度 25°C 。测定游离药物浓度的和测定总药物浓度的缓冲条件分别为 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液和含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris 的 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液, pH 7.4。在 2 次进样之间,使用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液、双蒸水和上述运行缓冲液分别冲洗毛细管 2、1 和 2 min 。检测波长 190 nm 。

5 方法学评价

5.1 线性关系 取出 4°C 保存的 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 丙吡胺储备液,以双蒸水采用逐级稀释法稀释成 25.0 、 12.5 、 6.3 、 3.1 、 2.0 、 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列浓度丙吡胺溶液,按照平行性原则每个浓度点平行配制 5 份,采用测定游离药物浓度的缓冲条件进样测定峰面积,取其平均值进行线性回归分析。游离丙吡胺的质量浓度在 $1.0\sim 25.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积呈现良好的线性关系(图 1),回归方程:

$$Y=339.55X+30.561 \quad R^2=0.9999$$

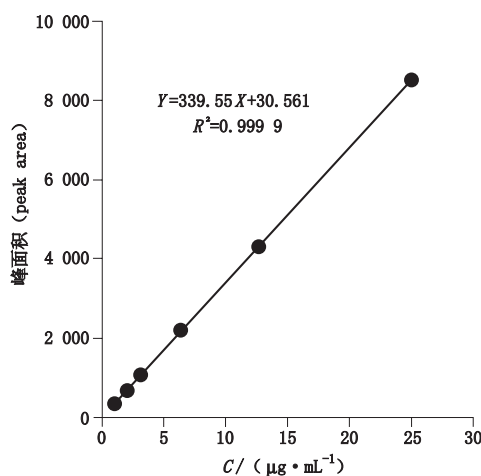


图 1 丙吡胺游离药物浓度标准曲线

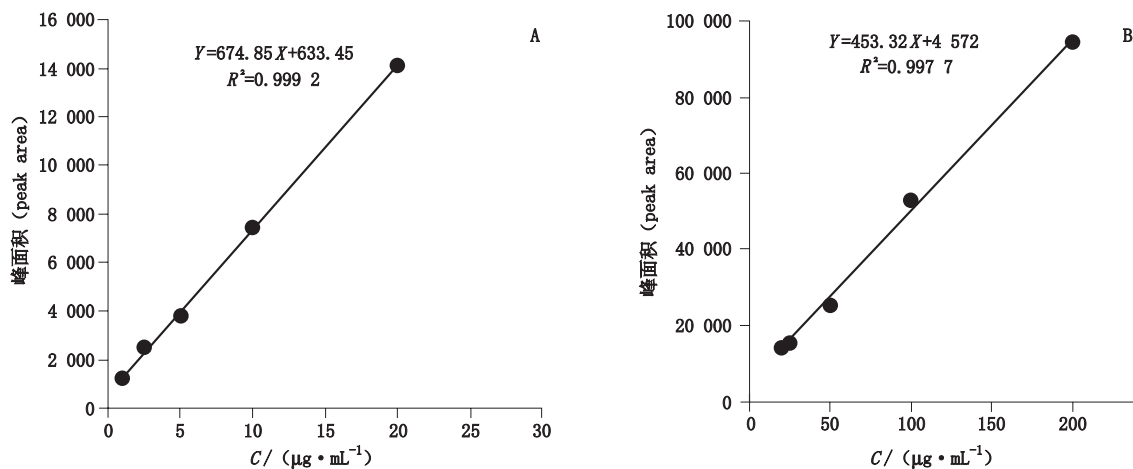
Fig. 1 Standard curve of free disopyramide concentration

再取 4°C 保存的 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 丙吡胺储备液配制的不同浓度的丙吡胺溶液 $45 \mu\text{L}$,分别与 $855 \mu\text{L}$ 大鼠空白血浆同置于 7 mL 离心管中,涡旋混合 5 min ,制成质量浓度为 200.0 、 100.0 、 50.0 、 25.0 、 $20.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 20.0 、 10.0 、 5.0 、 2.5 、 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的含药血浆各 5 份($n=5$),采用测定总药物浓度的缓冲条件进样测定峰面积,取其平均值进行线性回归分析。丙吡胺质量浓度分别在 $1.0\sim 20.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $20.0\sim 200.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的低、高浓度区间内与峰面积呈现良好的线性关系(图 2-A、B)。回归方程分别为:

$$Y=674.85X+633.45 \quad R^2=0.9992$$

$$Y=453.32X+4572 \quad R^2=0.9977$$

5.2 精密度和回收率 在测定游离药物浓度的缓冲条件下,分别取低、中、高 3 个浓度点的丙吡胺溶液各 5 份进行测定,计算日内精密度 RSD 在 $2.9\%\sim 6.3\%$ 之间,日间精密度 RSD 在 $0.56\%\sim 4.8\%$ 之间,方法回收率 $97.2\%\sim 102.1\%$ 。同理,在测定总药物浓度的缓冲条件下(使用 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris 的 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷



A. $X=1.0\sim 20.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ B. $X=20.0\sim 200.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

图2 丙吡胺总药物浓度标准曲线

Fig. 2 Standard curves of total disopyramide concentrations

酸盐缓冲溶液),分别取低、中、高3个浓度点的丙吡胺溶液各5份进行测定,计算所得日内精密度RSD在6.1%~6.9%之间,日间精密度RSD在2.6%~5.9%之间,方法回收率93.8%~110.7%,具体见表1。

表1 在测定游离药物浓度和总药物浓度缓冲条件下的方法回收率和精密度考察结果($n=5$)

Tab. 1 Analysis of recovery and precision of the method for free and total disopyramide in rat plasma

条件 (condition)	C/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率 (recovery)/ %	精密度 (precision), RSD/%	
			日内 (intra-day)	日间 (inter-day)
游离药物缓 冲条件 (buffer system for free drug)	12.5	100.9	6.3	5.2
	6.3	102.1	2.9	4.0
	2.0	97.2	5.4	4.4
总药物缓冲 条件 (buffer system for total drug)	10	101.2	6.1	2.6
	5.0	93.8	6.9	5.2
	2.5	110.7	6.6	5.9

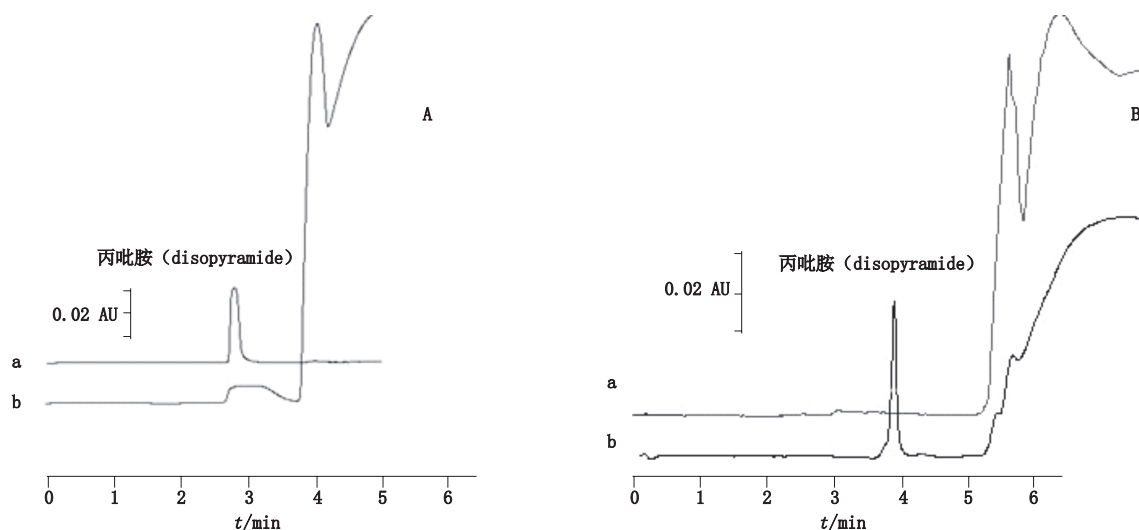
5.3 稳定性 主要考察大鼠血浆样品中含有的丙吡胺的冻融稳定性。取适量丙吡胺溶液加入到空白血浆中,配制质量浓度分别为10.0、5.0、2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的丙吡胺含药血浆各10份,其中5份在涡旋混合之后,分别置于4℃和-20℃反复冻融3次,按照测定总药物浓度的电泳条件进行测定,峰面积为 A_1 ,另外5份涡旋混合后相同条件下直接进样,峰面积为 A_2 。以 $A_1/A_2\times 100\%$ 进行计算,平均值范围为99.2%~101.3%,表明稳定性良好。

5.4 检测限和定量限 取丙吡胺溶液($1.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),加入不同量的磷酸盐缓冲液,涡旋混合5 min,即得质量浓度 $<1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列丙吡胺溶液各5份,按照测定游离药物浓度的毛细管电泳条件进行测定,得到丙吡胺游离药物浓度的检测下限($S/N\geq 3$)为 $0.2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,定量下限($S/N\geq 10$)为 $0.7\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。同理,按照测定总药物浓度的毛细管电泳条件进行测定,得到丙吡胺总药物浓度的检测下限($S/N\geq 3$)为 $0.2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,定量下限($S/N\geq 10$)为 $0.7\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

5.5 专属性 取6份来自不同大鼠的空白血浆,配制含 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丙吡胺的含药血浆,在测定游离药物浓度的电泳条件下测定其电泳图谱,代表图如图3-A所示。同理,取6份来自不同大鼠的空白血浆,配制含 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丙吡胺的血浆样品,在测定总药物浓度的电泳条件下测定其电泳图谱,代表图如图3-B所示。在测定中没有干扰丙吡胺测定的杂峰,专属性良好。

6 血浆样品中丙吡胺游离药物浓度和总药物浓度的测定

6.1 体外样品中丙吡胺大鼠血浆蛋白结合率的测定 将5种不同浓度的丙吡胺溶液和相应的空白血浆涡旋混合5 min,配成5种浓度的含药血浆各5份(100、50、25、12.5、10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。采用测定总药物浓度的条件对含药血浆进行毛细管电泳分析,所得峰面积使用含药血浆的回归方程得丙吡胺的血药浓度 C_t (总浓度)。将含药血浆置于37℃细胞箱中预温孵30 min后,直接使用测定游离药物浓度的条件进行毛



A: a. 丙吡胺对照品 (disopyramide reference substance) b. 丙吡胺含药血浆 (disopyramide plasma samples)

B: a. 空白血浆样品 (blank plasma sample) b. 丙吡胺含药血浆 (disopyramide plasma samples)

图3 专属性图谱

Fig. 3 The electropherograms of selectivity

细管电泳分析,所得峰高使用对照品溶液的标准曲线得丙吡胺的游离药物浓度 C_u 。按 $\left(1 - \frac{C_u}{C_t}\right) \times 100\%$ 计算

丙吡胺大鼠血浆蛋白结合率。

当大鼠血浆中加入丙吡胺的质量浓度为 100、50、25、12.5、10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,血浆蛋白结合率的平均值 ($n=5$) 分别为 86.7%、86.3%、86.4%、78.3%、74.7%,该结果与其他文献报道的结果^[11]相互吻合,说明该方法的测定结果具有可靠性。

6.2 丙吡胺大鼠血浆蛋白结合常数的计算 由 Scatchard 曲线的方法可知,在获得了不同浓度的含药血浆中的游离药物浓度 C_u 和结合浓度 C_b 时,根据公式变换可得到下面的公式:

$$\frac{C_u}{C_b} = -K_a \cdot C_u + K_a \cdot B_m$$

其中的 B_m 为常数,其值为药物在蛋白上的饱和结合量。如果对 C_u 和 $\frac{C_u}{C_b}$ 作图,浓度单位 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,该

曲线的斜率即为 K_a 值,也即结合常数。采用“6.1”项中的数据,当丙吡胺血浆生物样品中的质量浓度分别为 100.0、50.0、25.0、12.5、10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,转换为 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为单位,做 Scatchard 曲线拟合得图 4。结果由于图中曲线存在拐点,所以判定出丙吡胺与大鼠血浆蛋白的结合具有 2 个结合位点:1 个属于强结合,结合常数为 $5.3 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$; 另外 1 个属于弱结合,结合常数为 $1.2 \times 10^2 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 。

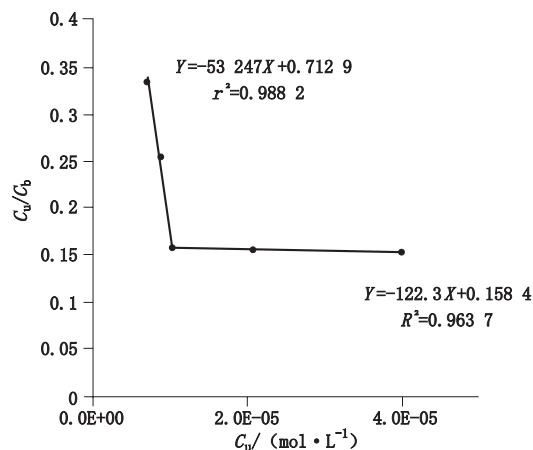


图4 丙吡胺与血浆蛋白结合的 Scatchard 曲线

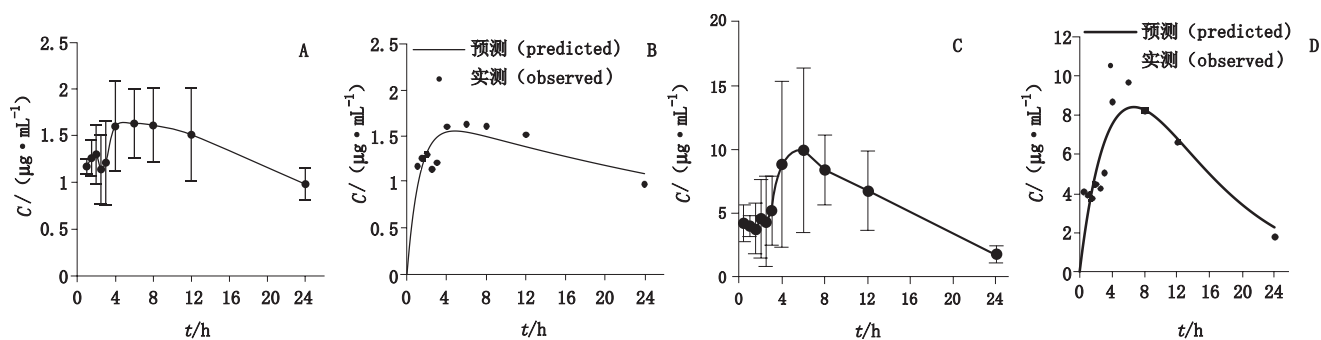
Fig. 4 The Scatchard curve of disopyramide binding with plasma protein

6.3 体内样品中丙吡胺大鼠血浆蛋白结合率的测定 按“3”项下方法得到实际的含有丙吡胺的大鼠血浆样品。一部分采用测定游离药物浓度的电泳条件计算游离药物浓度 C_u ,一部分采用测定总药物浓度的电泳条件计算总药物浓度 C_t ;结果大鼠体内丙吡胺血浆蛋白结合率的的平均值范围为 39.3%~91.5%,体内样品中丙吡胺的总质量浓度范围为 1.5~20.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在体外含药血浆质量浓度为 10.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,所测结合率的平均值为 85.41%,在体内样品所测的结合率范围之内。根据其趋势来看,由于总药物浓度的趋势是先增高后降低,血浆蛋白结合率随着总血

药浓度先增高后降低,与文献报道^[12-13]基本吻合,具有很高的可靠性。

6.4 丙吡胺游离药物浓度药时曲线的绘制及模型拟合 使用“6.3”项中测得的游离药物浓度和时间的关系绘制出游离药时曲线(图 5-A),并对其进行

拟合,与一室模型的最为契合,相关性 R^2 为 0.984 7。由于 0.5 h 的数据点偏离过大,拟合时舍弃。所得药动参数如表 2,一室模型的公式如下: $C=A(e^{-kt}-e^{-k_a t})$, 其中 $A=1.75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $k_a=0.777 \text{ h}^{-1}$, $k=0.019 \text{ h}^{-1}$ 。拟合图见图 5-B。



A. 游离药物浓度药时曲线 (concentration-time curve of free disopyramide) B. 丙吡胺游离药物浓度一室模型拟合图 (predicted models of freedisopyramide) C. 丙吡胺总药物浓度药时曲线 (concentration-time curve of total disopyramide) D. 丙吡胺总药物浓度一室模型拟合图 (predicted models of total disopyramide)

图 5 丙吡胺游离和总药物浓度药时曲线及房室模型拟合图

Fig. 5 Concentration-time curves and predicted models of free and total disopyramide

表 2 丙吡胺游离药物浓度和总药物浓度药代动力学参数

Tab. 2 The pharmacokinetics parameters of free and total disopyramide

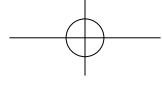
参数 (parameter)	单位 (unit)	数值 (游离药物) (value of free drug)	数值 (总药物) (value of total drug)
$t_{1/2} (k_a)$	h	0.9	4.4
$t_{1/2} (k_{10})$	h	35.0	4.8
V/F	$\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$	175.6	13.4
CL/F	$\text{mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	3.5	1.9
$T_{\max}$	h	4.9	6.7
$C_{\max}$	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	1.6	8.6
AUC_{0-t}	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$	31.2	136.7
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$	86.4	156.5
AUMC	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^2$	4 479.6	2 093.9
MRT	h	51.9	13.4

6.5 丙吡胺总药物浓度药时曲线的绘制及模型拟合 使用“6.3”项中测得的总药物浓度和时间的关系绘制出丙吡胺总药时曲线(图 5-C),并对其进行拟合,一室模型相对于非房室模型和二室模型具有更

高的 R^2 值,为 0.960 0,故采用 PK-Solver 的一室模型进行参数拟合。药代动力学参数如表 2 所示,拟合图如图 5-D,拟合公式为 $C=A(e^{-kt}-e^{-k_a t})$, 其中 $A=268.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $k_a=0.16 \text{ h}^{-1}$, $k=0.14 \text{ h}^{-1}$ 。

丙吡胺大鼠血浆中总药物浓度,即丙吡胺大鼠血浆药浓度的药时曲线与丙吡胺在人类血浆样品中的药时曲线形状相似。人血浆中丙吡胺 $t_{1/2}$ 约 4~10 h^[14-15],与本文测定结果相互印证。

不难看出游离药物的吸收速率常数 k_a 小于总药物,但是消除速率常数 k_{10} 却远大于总药物,这说明游离药物在机体内比总药物更为迅速地消除,对机体相互作用的影响起更大作用,在临床测定上更有参考意义。游离药物的表观分布容积 (V/F) 远远大于总药物的表观分布容积,说明游离药物在机体内的分布远大于总药物;目前采用总血药浓度判断丙吡胺毒性总是难以判断,如果采用体内广泛分布的游离药物浓度来进行判断就会更为精确。游离药物的清除率也高于总药物,结合游离药物更高的分布容积来看,游离药物在机体内比总药物进行了更多更快速的分布和清除,即游离药物浓度的相对变化更快更大,与总药物浓度的变化相比,具有更多研究意义。游离药物的达峰时间与总药物达峰时间不同,游离药物达峰时间更短,说明游离药物在体内更早地达到治疗浓度,



而平均驻留时间 (MRT) 又高于总药物, 说明游离药物在体内驻留更久, 因此更应该测定和监测游离药物浓度; 如果只监测总药物浓度, 有可能在总药物浓度较低的时候, 游离药物浓度还维持在较高水平, 这也可能是一些意外毒性事件发生的原因。游离药物的浓度低于总药物浓度, 故正常情况下游离药物药时曲线下面积 (AUC) 小于总药物的药时曲线下面积。综上, 游离丙吡胺在体内的分布更广, 与机体的代谢和相互作用更多更迅速, 其浓度更早达到较高浓度且维持更久, 相比总药物浓度具有更大的临床意义。因此, 建议在对丙吡胺的药代动力学的研究中, 更应该使用游离药物浓度, 或者至少对游离药物浓度给予重视。

7 讨论

7.1 在线破坏丙吡胺与血浆蛋白结合方法的优化 为了达到在线破坏丙吡胺和血浆蛋白的结合, 使结合的丙吡胺充分释放从而测得丙吡胺总血药浓度的目的, 尝试了如下一系列可能的条件。

考察不同 pH 对丙吡胺和血浆蛋白结合的影响, 将缓冲溶液换为 pH 9.0 的 Tris-HAc 缓冲溶液、pH 3.0 的 Tris-HAc 缓冲溶液时, 结果如图 6-A、B; 考察不同添加物对丙吡胺和血浆蛋白的结合的影响, 尝试加入有机试剂, 将缓冲溶液换为甲醇-磷酸盐缓冲液 (1:1) 或 (1:3)、乙腈-甲醇-磷酸盐缓冲液 (1:2:1), 结果如图 6-C、D、E; 在磷酸盐缓冲环境中加入不同浓度 (0.1%、1%) 的十二烷基硫酸钠 (SDS) 作为缓冲溶液, 结果如图 6-F、G; 考察不同缓冲系统对丙吡胺和血浆蛋白结合的影响, 使用生物试验常用的 Hepes 缓冲溶液, 结果如图 6-H; 在尝试使用 20 mmol·L⁻¹ Tris-HAc (pH 7.4) 作为缓冲溶液时, 所得电泳图谱如图 6-I 所示。从图 6-A~H 中可以看出, 丙吡胺血浆样品的峰形对比丙吡胺对照品都存在降低和展宽, 表示丙吡胺与血浆蛋白仍然存在结合作用, 丙吡胺并未被完全释放, 无法应用于定量测定; 但是从图 6-I 可以看出, 在使用了 Tris-HAc (pH 7.4) 作为缓冲的情况下, 血浆样品 (b) 中的丙吡胺峰形与丙吡胺对照品 (a) 中丙吡胺峰形类似, 认为其可逆结合受到破坏, 推测是由于 Tris 的引入而引起丙吡胺与血浆蛋白的结合被破坏。

7.2 电泳条件的优化 考察了 Tris 浓度的影响, 配制含有 20、40、50 mmol·L⁻¹ Tris 的磷酸盐缓冲

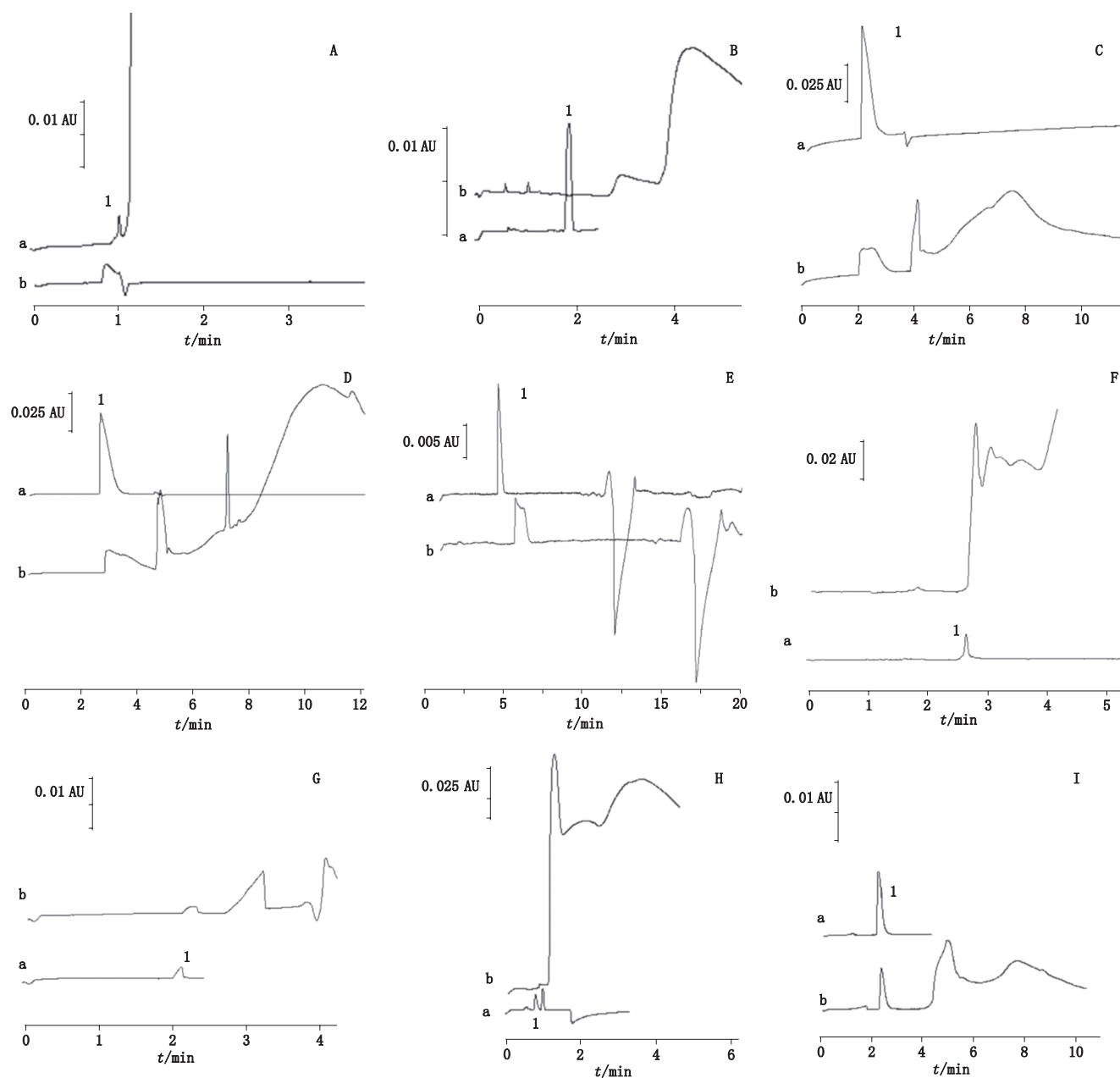
液, 并且进行丙吡胺与含 100 μg·mL⁻¹ 丙吡胺的含药血浆的测定。结果见图 7, 表明 Tris 的引入确实破坏了丙吡胺与血浆蛋白的结合, 而且 Tris 浓度为 50 mmol·L⁻¹ 时得到最高的回收率 98.3%, 可以应用该浓度进行试验。由于是测定体内血浆蛋白结合率的方法, 要尽量模拟大鼠体内代谢环境, 故采用 pH 7.4。考察了电压 7~30 kV 时对分离的影响, 结果增大电压可以得到更高柱效, 但是产生更多焦耳热, 综合考虑柱效和分离效果, 采用电压 15 kV 时最为合适。测定丙吡胺在血浆中的游离浓度时, 由于其游离浓度特别低, 加上血浆本身物质的干扰, 丙吡胺本身的末端吸收又较为灵敏, 综合考虑, 采用 190 nm 波长进行检测。

经初步分析认为, 由于血浆蛋白中与丙吡胺结合的 α-酸性糖蛋白为电负性基团, 在类似人体生理环境的磷酸盐缓冲溶液中, 丙吡胺药物基团能与其顺利结合并且在电泳中显示出降低展宽的色谱峰, 换用含 50 mmol·L⁻¹ Tris 的磷酸盐缓冲液后, Tris 基团带有强的正电性, 而且样品处于大量的 Tris 包围的环境中, 从而抑制了丙吡胺与血浆蛋白的结合, 使丙吡胺基本释放出来, 从而能够直接测定丙吡胺的总药物浓度。

8 结论

由于丙吡胺是一种典型非线性动力学的药物, 总药物浓度的药时曲线下面积与给药剂量不成正比。临床上经常需要对其游离药物浓度进行监测。虽然国内外关于药物血浆蛋白结合的研究报道很多, 测定游离药物和总药物浓度的方法也不少, 但是由于本文开发的新方法具有可以采用血浆样品直接进样, 并且测定耗时极短等优势, 有望作为临床监测手段进行应用。

本文从创新的角度出发, 成功地利用毛细管区带电泳技术, 以丙吡胺为模型药物, 建立了通过毛细管电泳实现的简便、快速、准确及耗样品量少的在线测定丙吡胺的游离浓度和总药物浓度的新方法, 而且该方法可以使用血浆样品直接进样在线测定, 避免了繁杂的前处理过程。本文利用其测定了丙吡胺的大鼠体内外的血浆蛋白结合率, 该结果与其他文献报道的结果相互吻合; 测定了丙吡胺的血浆蛋白结合常数; 绘制了丙吡胺游离药物浓度和总药物浓度的药时曲线, 并进行了模型拟合和讨论; 证明了使用游离药物



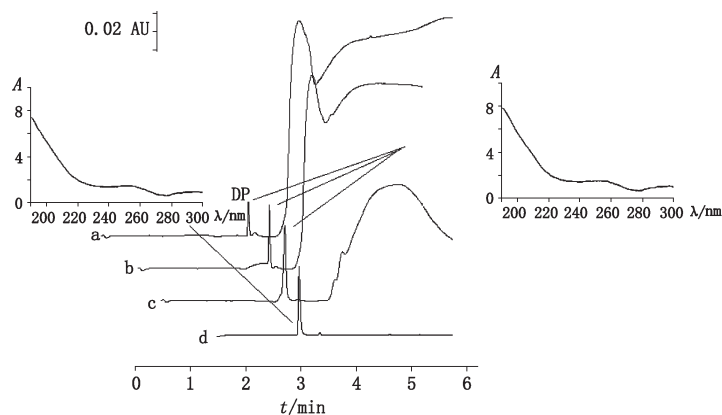
1. 丙吡胺 (disopyramide)

a. 丙吡胺对照品 (disopyramide reference substance) b. 含药血浆 (disopyramide plasma samples)

A. Tris-HAc 缓冲溶液, pH 9.0 (Tris-HAc buffer, pH 9.0) B. Tris-HAc 缓冲溶液, pH 3.0 (Tris-HAc buffer, pH 3.0) C. 甲醇-磷酸盐缓冲溶液 (1:1) [methanol-phosphate buffer (1:1)] D. 甲醇-磷酸盐缓冲溶液 (1:3) [methanol-phosphate buffer (1:3)] E. 乙腈-甲醇-磷酸盐缓冲溶液 (1:2:1) [acetonitrile-methanol-phosphate buffer (1:2:1)] F. 磷酸盐缓冲溶液中加入 0.1% SDS (phosphate buffer mixed with 0.1% SDS) G. 磷酸盐缓冲溶液中加入 1% SDS (phosphate buffer mixed with 1% SDS) H. Hepes 缓冲溶液 (Hepes buffer) I. 20 mmol · L⁻¹ Tris-HAc 缓冲溶液, pH 7.4 (20 mmol · L⁻¹ Tris-HAc buffer, pH 7.4)

图 6 不同探索条件下试验与对照峰形对比图

Fig. 6 Electrophoregrams of control group and experimental group



a. 含 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris 的丙吡胺生物样品 (disopyramide plasma samples with $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris) b. 含 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris 的丙吡胺生物样品 (disopyramide plasma samples with $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris) c. 含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris 的丙吡胺生物样品 (disopyramide plasma samples containing $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris) d. 丙吡胺对照品 (disopyramide reference substance)

图 7 采用含不同浓度 Tris 的缓冲溶液的对比电泳图

Fig. 7 The electropherograms with different concentrations of Tris in buffer

浓度比总血药浓度对丙吡胺的临床研究具有更重大的意义。该方法为药物的血浆蛋白结合的测定提供一种全新的可能性,并且希望能够对其他研究者有一些启发作用,加强方法的推广和应用。

参考文献

- [1] BEERAM S, BI C, ZHENG X, *et al.* Chromatographic studies of drug interactions with alpha 1-acid glycoprotein by ultrafast affinity extraction and peak profiling [J]. J Chromatogr A, 2017, 1497: 92
- [2] BAKER MA, SCHNEIDER EK, X Huang J, *et al.* The plasma protein binding proteome of ertapenem: a novel compound-centric proteomic approach for elucidating drug-plasma protein binding interactions [J]. ACS Chem Biol, 2016, 11 (12): 3353
- [3] SANDBLAD P, ARNELL R, SAMUELSSON J, *et al.* Approach for reliable evaluation of drug proteins interactions using surface plasmon resonance technology [J]. Anal Chem, 2009, 81 (9): 3551
- [4] 杨乐婷,谢荟茹,张晞倩,等. LC-MS/MS 法测定人血浆中奈必洛尔的浓度及其药动学应用 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36 (12): 2094
YANG LT, XIE HR, ZHANG XQ, *et al.* HPLC-MS/MS determination of nebivolol in human plasma and its application in pharmacokinetic study [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36 (12): 2094
- [5] SUSANTO H, ARAFAT H, JANSSEN EML, *et al.* Ultrafiltration of polysaccharide-protein mixtures: elucidation of fouling mechanisms and fouling control by membrane surface modification [J]. Sep Purif Technol, 2008, 63 (3): 558
- [6] ZHAO H, MAYER ML, SCHUCK P. Analysis of protein interactions with picomolar binding affinity by fluorescence-detected sedimentation velocity [J]. Anal Chem, 2014, 86 (6): 3181
- [7] BI C, JACKSON A, VARGAS-BADILLA J, *et al.* Entrapment of alpha 1-acid glycoprotein in high-performance affinity columns for drug-protein binding studies [J]. J Chromatogr B, 2016, 1021: 188
- [8] LIU Y, LORD H, MACIĄŻEK-JURCZYK M, *et al.* Development of an immunoaffinity solid phase microextraction method for the identification of penicillin binding protein 2a [J]. J Chromatogr A, 2014, 1364: 64
- [9] QU H, MUDALIGE TK, LINDER SW. Capillary electrophoresis coupled with inductively coupled mass spectrometry as an alternative to cloud point extraction based methods for rapid quantification of silver ions and surface coated silver nanoparticles [J]. J Chromatogr A, 2016, 1429: 348
- [10] LIU Y, ZHANG S, LING X, *et al.* Analysis of the interactions between the peptides from secreted human CKLF1 and heparin using capillary zone electrophoresis [J]. J Pept Sci, 2008, 14 (8): 984
- [11] KATSU T, MORI Y. Determination of free disopyramide in blood serum in situ using a disopyramide-sensitive membrane electrode [J]. Anal Chim Acta, 1997, 343 (1-2): 79
- [12] KRATOCHWIL NA, HUBER W, MÜLLER F, *et al.* Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach [J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64 (9): 1355
- [13] 周玲玲,袁吉培,汪尔康. 毛细管电泳电化学发光用于丙吡胺及其与血浆蛋白结合率的测定 [J]. 分析化学, 2009, 37 (1): 53
ZHOU LL, YUAN JP, WANG EK. Determination of disopyramide and its binding rate with plasma protein studied by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection [J]. Chin J Anal Chem, 2009, 37 (1): 53
- [14] LIMA JJ, BOUDOULAS H, SHIELDS BJ, *et al.* Stereoselective pharmacokinetics of disopyramide enantiomers in man [J]. Drug Metab Dispos, 1985, 13 (5): 572
- [15] BRYSON SM, WHITING B, LAWRENCE JR, *et al.* Disopyramide serum and pharmacologic effect kinetics applied to the assessment of bioavailability [J]. Br J Clin Pharmacol, 1978, 6 (5): 409

(本文于 2017 年 5 月 8 日收到)