

苯环喹溴铵血浆蛋白结合率测定

Determination of Plasma Protein Binding Rate of Bencycloquidium Bromide

徐勤¹, 丁黎¹, 刘文英¹, 陈小平², 李荣姗¹

XU Qin¹, DING Li¹, LIU Wen-ying¹, CHEN Xiao-ping², LI Rong-shan¹

(1. 中国药科大学药物分析教研室, 江苏南京 210009; 2. 北京世桥生物技术有限公司 北京 100080)

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu, 210009, China; 2. Beijing Shiqiao Biological and Pharmaceutical Co. Ltd., Beijing, 100080, China)

摘要: 为了测定苯环喹溴铵大鼠和人的血浆蛋白结合率, 将大鼠和人的血浆样品加入内标后用甲醇直接沉淀法进行 LC/ESI/MS 分析, 然后采用平衡透析法测定大鼠和人血浆中苯环喹溴铵的血浆蛋白结合率。结果表明, 苯环喹溴铵大鼠血浆中药物浓度为 105.2~1842 ng/ml, 血浆蛋白结合是线性的, 苯环喹溴铵与大鼠血浆蛋白结合率约为 42.0%; 苯环喹溴铵人血浆中药物浓度为 305.3~3813 ng/ml, 血浆蛋白结合是线性的, 与人血浆蛋白结合率约为 71.4%。苯环喹溴铵在不同种属中的血浆蛋白结合率是不同的, 与人的血浆蛋白结合率较大鼠的血浆蛋白结合率高, 且与人的血浆蛋白具有中等强度的结合。

关键词: 苯环喹溴铵 血浆蛋白 结合率 平衡透析法

中图分类号: O626.4; R969.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2007)04-0397-03

Absrtact: The plasma protein binding rate of bencycloquidium bromide of rats and human were determined. After addition of internal standard, the plasma samples were deproteinized with methanol, and the supernatant was assayed by LC/ESI/MS. Equilibrium dialysis was employed to determine the plasma protein binding rate of bencycloquidium bromide in rats and human. The plasma protein binding rate of bencycloquidium bromide with rats and human plasma were 42.0% and 71.4%, respectively. The ranges of plasma concentration of bencycloquidium bromide were 105.2 to 1842 ng/ml for rats and 305.3 to 3813 ng/ml for human, respectively, in which the plasma protein binding was linear. The plasma protein binding rate of bencycloquidium bromide in various species was different. The plasma protein binding rate of bencycloquidium bromide in human was greater than in rats and the binding rate of bencycloquidium bromide with human plasma protein was middling strength.

Key words: bencycloquidium bromide, plasma protein, binding rate, equilibrium dialysis

苯环喹溴铵的化学名为 3-((2-环戊基-2-羟基-2-苯基)乙氧基)-1-甲基-溴化-1-氮杂双环{2,2,2}辛烷, 通用名为苯环喹溴铵。它是一种新的抗胆碱能化合物, 药理作用基本与异丙基阿托品一致, 对中枢胆碱能受体无作用。苯环喹溴铵对胆碱能受体有明显的选择性(对 M2 受体无明显作用), 因此不会造成心动

过速或尿潴留等副反应, 是一个理想的抗鼻炎候选药。与异丙阿托品相比, 苯环喹溴铵适应人群更广, 临床上拟用于治疗常年性过敏性鼻炎、常年性非过敏性鼻炎和各种急性鼻炎如感冒引起的鼻腔粘膜分泌过度症状等^[1]。我们对苯环喹溴铵在动物体内的药代动力学进行研究。药物血浆蛋白结合率是药物体内重要的参数之一, 影响药物在体内的分布、排泄和代谢速率, 对药物的消除半衰期也有影响。更重要的是它密切关系到药物的药理作用强度。关于该药物的血浆蛋白结合率未见有文献报道, 因此, 本研究采用平衡透

收稿日期: 2006-12-22

修回日期: 2007-01-12

作者简介: 徐勤(1971-), 女, 副教授, 主要从事药物分析工作。

析法测定大鼠和人血浆中苯环喹溴铵的血浆蛋白结合率,为临床用药提供参考资料。

1 实验材料与方法

1.1 仪器

Agilent 1100 LC-MS SL 联用仪,含:双高压泵、自动进样器、柱温箱、电喷雾离子化接口、四极杆质谱检测器。色谱工作站:Agilent ChemStation (10.02A)。XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂生产)和 80-2 离心机(上海手术器械厂生产),高速台式离心机 1612-1 型高速离心机(上海金达生化仪器有限公司出品)。

1.2 受试药物、试剂和试剂

苯环喹溴铵对照品(北京世桥生物制药有限公司提供,批号:031120,纯度:99.5%),内标:1-乙基-苯环喹溴铵,化学名:3-((2-环戊基-2-羟基-2-苯基)乙氧基)-1-乙基-溴化-1-氮杂双环{2,2,2}辛烷,由北京世桥生物制药有限公司提供,批号:041205,纯度:98.0%。试验用水为去离子水,甲醇为色谱纯,其它试剂均为市售分析纯。

透析袋的规格为管状透析袋(直径 34 mm,截留量 12000~14000 分子量,购自上海绿鸟科技发展有限公司,批号:041225,有效期为 3 年。正常人血浆由南京市红十字会血液中心提供,批号:20050410。

1.3 动物

SD 大鼠,体重 180~250 g,Ⅱ级,由南京医科大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(苏)2002-0031。

1.4 实验方法

1.4.1 LC-MS 测定条件

色谱柱:Lichrospher C₁₈(dp 5 μm,4.6×250 mm ID,江苏汉邦科技股份有限公司出品);流动相:甲醇(含 40 mmol·L⁻¹醋酸铵和 1%甲酸)-水溶液(75:25,V/V);流速:1.0 ml·min⁻¹;柱温:25℃。

离子检测方式为选择性离子检测(SIM);裂解电压:150V;离子极性:正离子(Positive);离子化方式:气动辅助电喷雾离子化(ESI);检测对象:苯环喹溴铵,[M]⁺离子 m/z 330.2,1-乙基-苯环喹溴铵,[M]⁺离子 m/z 344.2;干燥气流速:10.0 L·min⁻¹;雾化室压力:45 psig.;干燥气温度:350℃;毛细管电压:3 kV。

1.4.2 血浆样品的处理

精密吸取 30 μl 血浆样品,置 0.25 ml 离心管中,加入 1.5 μg·ml⁻¹内标溶液 10 μl,旋涡 30 s,再加入甲醇 120 μl,旋涡 3 min,室温放置 15 min 除去蛋白

后,于 16000 r·min⁻¹离心 5 min,吸取上清液转移至自动进样器样品瓶中,加入 30 μl 的流动相的水相,进行 LC-MS 分析,进样量 50 μl,用样品与内标峰面积比进行定量分析。

1.4.3 大鼠和人血浆蛋白结合率测定试验

大鼠和人血浆中苯环喹溴铵的血浆蛋白结合率测定采用平衡透析法^[2]。透析袋外药物起始浓度(ng·ml⁻¹)分别为 50.25、201.0、603.0 和 1508。每种浓度水平重复试验 5 次。透析袋外为 0.02 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(pH 值 7.40),内含 0.15 mol·L⁻¹氯化钠,袋内为 0.5 ml 大鼠肝素化血浆。置 4℃ 冰箱中放置 72 h 后,测定袋内外药物浓度。另取 4 份,袋外起始浓度(ng·ml⁻¹)分别为 50.25、201.0、603.0 和 1508,袋内用 0.5 ml 缓冲液代替血浆,作为空白对照,以考察药物与半透膜有无结合。

苯环喹溴铵大鼠和人血浆蛋白结合率计算公式^[3]如下:

$$\text{血浆蛋白结合率} = [1 - (\text{袋外浓度} / \text{袋内浓度})] \times 100\%$$

实验数据用计算机 Office Excel 软件进行 *t* 检验。

2 结果与分析

空白对照结果显示放置 72 h 后袋外浓度分别为 (65.17±0.51)ng·ml⁻¹,袋内浓度为 (62.43±1.99)ng·ml⁻¹。袋内外浓度相近,药物与透析袋膜结合可忽略不计,提示透析 72h 后达到平衡,用平衡透析法测定苯环喹溴铵大鼠和人血浆蛋白结合率测定结果见表 1 和表 2。以袋内蛋白结合型苯环喹溴铵浓度平均值(*Y*)对袋内苯环喹溴铵总浓度平均值(*X*)作回归计算得回归方程。

$$\text{大鼠: } Y = 0.4039X + 3.217, R^2 = 0.995;$$

$$\text{人: } Y = 0.6518X + 50.66, R^2 = 0.9998.$$

由表 1 和表 2 可见,苯环喹溴铵在大鼠血浆中浓度为 105.2~1842 ng·ml⁻¹,药物与血浆蛋白的结合呈线性关系($R^2 = 0.995$),苯环喹溴铵与大鼠血浆蛋白结合率约为 42.0%;苯环喹溴铵在人血浆中药物浓度为 305.3~3813 ng·ml⁻¹,血浆蛋白结合是线性的($R^2 = 0.9998$),苯环喹溴铵与人血浆蛋白结合率约为 71.4%。

t 检验结果表明,大鼠及正常人血浆组不同浓度时,苯环喹溴铵的血浆蛋白结合率无显著性差异($P > 0.05$);苯环喹溴铵与大鼠和正常人血浆的蛋白结合率之间有极显著性差异($P < 0.01$)。

表 1 苯环喹溴铵在大鼠血浆中的蛋白结合率(n=5)

Table 1 The plasma protein binding rate of bencycloquidium bromide in rats (n=5)

透析前袋 外浓度 Added C (ng/ml)	透析后袋 内浓度 Total C (ng/ml)	蛋白结合率 Plasma protein binding rate(%)					平均值 Average	SD
		1	2	3	4	5		
50.25	105.2	40.5	40.6	48.4	46.7	35.9	42.4	5.12
201.0	325.1	36.8	53.6	45.9	52.2	49.3	47.6	6.73
603.0	846.3	40.8	37.8	26.4	32.5	46.6	36.8	7.73
1508	1842	35.9	42.0	45.5	46.1	35.7	41.0	5.02

表 2 苯环喹溴铵在人血浆中的蛋白结合率(n=5)

Table 2 The plasma protein binding rate of bencycloquidium bromide in human (n=5)

透析前袋 外浓度 Added C (ng/ml)	透析后袋 内浓度 Total C (ng/ml)	蛋白结合率 Plasma protein binding rate(%)					平均值 Average	SD
		1	2	3	4	5		
50.25	305.3	82.7	72.4	72.0	80.3	80.7	77.6	5.06
201.0	754.6	75.9	75.4	78.3	64.5	76.2	74.1	5.46
603.0	1609	70.7	67.0	65.1	69.2	65.3	67.5	2.44
1508	3813	66.7	66.1	63.5	65.6	70.2	66.4	2.44

3 讨论

药物在体内转运、转化过程中,可与组织蛋白(包括受体)和体液蛋白相结合,因此在组织和体液中除含有游离的药物、游离的代谢产物之外,还含有结合的药物、结合的代谢产物。药物是通过体液输送到各器官和组织的,所以药物与体液中蛋白的结合非常重要。在常见的体液中,尿液含蛋白量极微,唾液含蛋白量仅为血浆中的 1/10 左右,血浆、血清富含蛋白(称为血浆蛋白)。由于血浆、血清主要生化成分几近相同,二者均作为分析样品,常常可互相代替。

血浆蛋白结合率的测定方法有平衡透析法、超滤

法、凝胶过滤法、超速离心法和白蛋白微球测定法等,以前两种方法较为常用。平衡透析法的优点是可测定处于平衡状态下的游离药物的浓度。本实验中将样品置 4℃ 冰箱中放置一段时间,经实验考察 72 h 后,苯环喹溴铵与蛋白结合达到平衡。

本次实验中采用 LC/ESI/MS 测定大鼠和人血浆中的药物浓度,该方法是本实验室建立并经过方法学确证是可行的^[4],每个生物样品测定在 5min 内完成分析,符合生物样品分析的要求。

本实验对比研究了苯环喹溴铵与大鼠和人血浆的蛋白结合率分别为(42.0±6.95)%和(71.4±6.06)%,说明不同种属间蛋白结合率是不同的,苯环喹溴铵与正常人的血浆蛋白结合率高于其与大鼠的血浆蛋白结合率,在临床应用时应考虑该药物与血浆蛋白结合的影响。

参考文献:

- [1] 李统威,赵书强,强洁青,等.一种含有季铵基团的奎宁类化合物及其制法和药物用途:中国,03121031.7[P]. 2003-03-21.
- [2] 中国食品药品监督管理局.化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则[S].药物审评中心,2005:8.
- [3] 王沈阳,丁黎,郝歆愚,等.替加色罗大鼠血浆蛋白的结合率测定[J].江苏药学与临床研究,2006,14(1):10-11.
- [4] XU Q,LI D,LIU W Y,et al.Determination of bencycloquidium bromide in rat plasma by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry[J].Journal of Chromatogr B,2007,846(1-2):209-214.

(责任编辑:邓大玉)

中美科学家发现抗菌药物新靶点

表皮葡萄球菌是人皮肤上的主要共生菌,通常情况下不会引起人类疾病。但是一旦附着在一些人造器官上,当这些器官移植入人体后,就会使病人产生许多并发症。这些表皮葡萄球菌很难被抗生素杀死,其机理也还不清楚。由于长期抗生素的滥用,导致许多细菌,特别是致病菌产生了耐药性,这已经成为目前医学界一个世界性难题。研究致病菌的耐药机制以及研发出新型抗菌药物迫在眉睫。

中美科学家利用基因芯片技术发现表皮葡萄球菌在被人抗菌肽防御素 3 刺激后,许多基因的表达发生改变,其中最重要的一个是 ABC 转运子表达的上调。接着,他们又利用基因敲除技术,证明三原素的调节子是感应抗菌肽、从而调节表皮葡萄球菌抗抗菌肽的独特调节子,而这一调节子与目前所发现的革兰氏阴性菌抗抗菌肽的二元素调节子完全不同,是革兰氏阳性菌所特有的。中美科学研究发现了控制革兰氏阳性菌感应抗菌肽的三原素感应系统,三原素感应系统就像一把钥匙,控制着细菌细胞膜表面抗抗菌肽基因(Dlt 和 mprF)的开关。这项研究成果解答了为什么一些细菌能生存于人的表皮从而与人共生的机理,同时为开发新型抗菌药物提供了新的靶点。

(据科学网)