

二-(2, 4-二氯苯甲酰异羟肟酸) 二苯基合锡大鼠血浆蛋白结合率的测定

郭 璞, 李云兰*, 李青山*

山西医科大学 药学院, 山西 太原 030001

摘要: 目的 建立二-(2, 4-二氯苯甲酰异羟肟酸) 二苯基合锡 (DPDCT) 在大鼠血浆中蛋白结合率的测定方法。方法 采用 HPLC 法测定大鼠血浆中药物总浓度及游离药物浓度, 结合平衡透析法测定血浆蛋白结合率。结果 DPDCT 在质量浓度为 0.2、1.0、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 时与大鼠的血浆蛋白结合率分别为 $(58.9 \pm 2.0)\%$ 、 $(57.4 \pm 1.2)\%$ 和 $(58.6 \pm 0.8)\%$ 。不同浓度组血浆蛋白结合率差异无统计学意义。结论 该方法灵敏度高, 重复性好, 操作简单, 能够满足生物样品分析的要求。DPDCT 具有中等强度的血浆蛋白结合率。

关键词: 二-(2, 4-二氯苯甲酰异羟肟酸) 二苯基合锡; HPLC; 平衡透析法; 血浆蛋白结合率

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2013)03-0176-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.03.004

Determination of plasma protein binding rate of diphenylpi-(2, 4-dichlorbenzohydroxamato) tin in rats

GUO Pu, LI Yun-lan, LI Qing-shan

College of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract: **Objective** To develop a method for the determination of the protein binding rate of diphenylpi-(2, 4-dichlorbenzohydroxamato) tin (IV) (DPDCT) in rat plasma. **Methods** The HPLC combined with equilibrium dialysis was carried out to determine the plasma protein binding rate of DPDCT. **Results** The plasma protein binding rates in rats were $(58.9 \pm 2.0)\%$, $(57.4 \pm 1.2)\%$, and $(58.6 \pm 0.8)\%$ when the concentration of DPDCT was 0.2, 1.0, and 5.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively. There was no significant difference in all groups. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate, and sensitive, and it could meet the requirement for analysis method of biological samples. DPDCT has medium plasma protein binding rates.

Key words: diphenylpi-(2, 4-dichlorbenzohydroxamato) tin; HPLC; equilibrium dialysis; plasma protein binding rate

二-(2, 4-二氯苯甲酰异羟肟酸) 二苯基合锡 (DPDCT) (图 1) 是一种新型的金属有机锡类抗肿瘤化合物, 该化合物对 HL-60、BGC-823、BEL-7402、KB 等细胞的增殖抑制率均在 80% 以上^[1], 是我国拥有自主知识产权的一个创新化合物, 目前处于临床前试验阶段。药物血浆蛋白结合率是药动学的重要参数之一, 是新药评价不可缺少的指标, 目前未见国内外测定 DPDCT 血浆蛋白结合率的相关报道。本研究建立了 DPDCT 在大鼠血浆及透析液中的含量测定分析方法, 并采用平衡透析法对 DPDCT 的大鼠血浆蛋白结合率进行测定, 为 DPDCT 的血药浓度监测及新药研发提供了方法和试验依据。

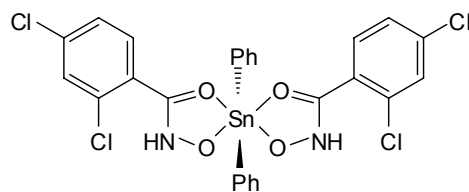


图 1 二-(2, 4-二氯苯甲酰异羟肟酸) 二苯基合锡的结构式

Fig. 1 Chemical structure of DPDCT

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters2695 高效液相色谱仪, 配有二极管阵列检测器; Empower 色谱工作站; TGL—16G 高速冷冻离心机 (上海安亭科学仪器厂); QL—901 型漩

收稿日期: 2013-02-18

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09103-104); 国家自然科学基金资助项目 (30973603); 山西省归国人员基金 (2010-54); 山西医科大学 08 博士启动基金

作者简介: 郭 璞 (1987—), 男, 汉族, 山西运城人, 在读硕士, 研究方向为药物分析和药物动力学。E-mail: guopusxmu@163.com

*通信作者 李云兰 (1971—), 女, 博士, 教授, 硕士生导师。Tel: (0351)4690071 E-mail: liyunlanrr@163.com

李青山 (1965—), 男, 博士, 教授, 博导。E-mail: sxlqs2012@163.com

涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。透析袋 MD25 (8 000~14 000) (鼎国生物技术有限公司)。

1.2 试剂

DPDCT 对照品(自制,三次重结晶,质量分数>99.0%);乙酰苯胺对照品(内标,中国食品药品检定研究院,质量分数>99.0%,批号040547-007);甲醇为色谱纯(天津市四友精细化学品有限公司);其他试剂均为分析纯;水为三蒸水。

1.3 实验动物

清洁级 SD 大鼠,体质量(200±20)g,山西医科大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(晋)2009-0001;大鼠腹主动脉取血,肝素抗凝,离心,分离血浆,-20℃贮藏,备用。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.5%磷酸水溶液(33:67, pH 3.0),体积流量为 0.8 mL/min,柱温为 25℃,检测波长为 228 nm,进样体积为 20 μL。

2.2 试液的配制

2.2.1 空白透析液 精密称取磷酸氢二钾 14.11 g,磷酸二氢钾 2.59 g,氯化钠 1.99 g 于 1 L 量瓶中,加三蒸水溶解并稀释至刻度,摇匀,得 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液^[2]。

2.2.2 DPDCT 储备液 精密称取 DPDCT 对照品 4.50 mg 于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为 450 μg/mL 的 DPDCT 储备液。

2.2.3 DPDCT 标准系列溶液 I 精密量取 DPDCT 贮备液适量,加甲醇稀释成质量浓度为 0.3、1.5、7.5、15.0、22.5、45.0 μg/mL 的标准系列溶液,用于透析内液的方法学研究。

2.2.4 DPDCT 标准系列溶液 II 精密量取 DPDCT 贮备液适量,加空白透析液稀释成质量浓度为 0.15、0.3、0.75、3.0、7.5、22.5 μg/mL 的标准系列溶液,用于透析外液的方法学研究。

2.2.5 DPDCT 标准系列溶液 III 精密量取 DPDCT 贮备液适量,加空白透析液稀释成质量浓度为 4.0、20、100 μg/mL 的标准系列溶液,用于蛋白结合率的研究。

2.2.6 内标溶液 精密称取乙酰苯胺对照品 10.0 mg,置 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,

精密量取 1 mL 溶液,置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,得 10.0 μg/mL 的内标溶液。

2.3 样品处理方法

2.3.1 透析内液样品(血浆)的处理 精密吸取血浆 200 μL,置具塞离心管中,加甲醇 200 μL,加乙酰苯胺内标溶液 200 μL,摇匀,涡旋混合 3 min 后,-4℃离心(13 000 r/min) 5 min,吸取上清液,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液 20 μL 注入高效液相色谱仪测定。

2.3.2 透析外液的处理 精密吸取透析外液 200 μL,置具塞离心管中,加甲醇 200 μL,加乙酰苯胺内标溶液 200 μL,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液 20 μL 注入高效液相色谱仪测定。

2.4 平衡透析实验方法

采用平衡透析法测定^[3] 将空白透析液浸泡后的透析袋(长度约 10 cm)一端折叠,用线结扎,将 1 mL 空白血浆加入透析袋中,透析袋内留有一小空气泡,将多余空气排出,并将透析袋的另一端折叠后用线扎紧,放置悬浮于盛有 20 mL 透析外液的具塞平底试管中,调节透析袋内外液面,使其保持同一水平,并使透析袋不靠管壁,以免影响药物透析。透析外液的质量浓度分别为 0.2、1.0、5.0 μg/mL。将具塞平底试管置 37℃恒温箱中,直到药物扩散达到平衡。分别测定透析袋内血浆药物浓度(总浓度 D_t)及透析袋外缓冲液中药物浓度(游离药物浓度 D_f),根据血浆蛋白结合率的计算公式 $f_b = (D_t - D_f)/D_t \times 100\%$ 计算血浆蛋白结合率,每个浓度的样品平行测定 5 次。透析结束后,用 10%高氯酸溶液检查透析袋外溶液有无蛋白漏出,有漏出者作废。

2.5 统计学分析

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SASS 软件处理数据,组间均数比较用 t 检验。

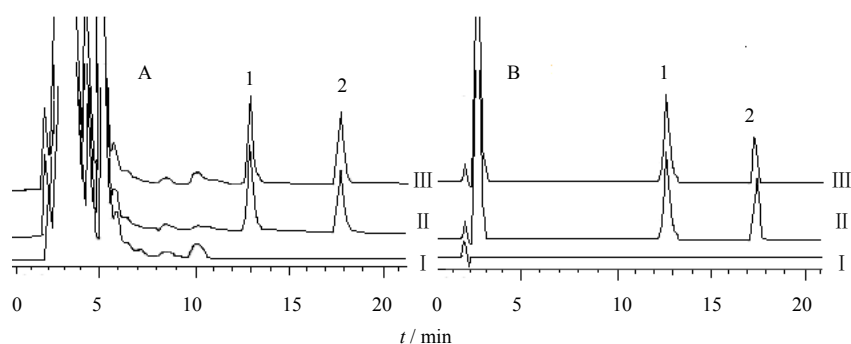
3 结果

3.1 方法专属性

在上述色谱条件下,乙酰苯胺(内标)和 DPDCT 的色谱峰能与内源性物质完全分离,保留时间分别为 12.9、17.8 min。见图 2。

3.2 标准曲线

3.2.1 透析内液 取空白血浆 200 μL,加入 200 μL DPDCT 标准系列溶液 I 和 200 μL 内标溶液,使 DPDCT 终质量浓度分别为 0.1、0.5、2.5、5.0、7.5、15.0 μg/mL。按“2.3”项下方法操作,以样品质量



A- I -空白血浆 II -空白血浆+内标+DPDCT III-血浆样品 B- I -空白透析液 II -空白透析液+内标+DPDCT III-透析外液样品 1-内标 2-DPDCT

A- I -blank plasma II - blank plasma + IS + DPDCT III- plasma sample. B- I -blank extracellular fluid microdialysis II-blank extracellular fluid microdialysis + IS + DPDCT III-extracellular fluid microdialysis sample. 1-IS 2-DPDCT

图2 二-(2,4-二氯苯甲酰异羟肟酸) 二苯基合锡的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of DPDCT

浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标, DPDCT 与内标面积之比为纵坐标作图。透析内液回归方程为 $Y=0.0531X-0.0247$ ($r=0.9991$, $n=6$)。根据标准曲线, DPDCT 在 $0.1\sim 15.0\ \mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。当 DPDCT 峰高为仪器响应噪音的 3 和 10 倍量时, 测得透析内液中 DPDCT 的检测限和定量限分别为 35、100 ng/mL。

3.2.2 透析外液 取空白透析液 200 μL , 加入 200 μL DPDCT 标准系列溶液 II 和内标溶液 200 μL , 使 DPDCT 终质量浓度分别为 0.05、0.1、0.25、1.0、2.5、7.5 $\mu\text{g/mL}$ 。按“2.3”项下方法操作, 以样品质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标, DPDCT 与内标峰面积之比为纵坐标作图。透析外液回归方程为 $Y=0.0379X-0.0081$ ($r=0.9996$, $n=6$)。根据标准曲线, DPDCT 在 $0.05\sim 7.5\ \mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。当 DPDCT 峰高为仪器响应噪音的 3 和 10 倍量时, 测得透析外液中 DPDCT 的检测限和定量限分别为 17、50 ng/mL。

3.3 准确度和精密度

3.3.1 透析内液 取空白血浆 200 μL , 按“3.2”项下方法操作, 配制成低、中、高 3 个质量浓度 (0.3、3.0、12.0 $\mu\text{g/mL}$) 的模拟生物样品。考察方法的日内和日间精密度 (RSD) 和准确度 (RE)。结果见表 1。

3.3.2 透析外液 取空白血浆 200 μL , 按“3.2”项下方法操作, 配制成低、中、高 3 个质量浓度 (0.1、1.0、5.0 $\mu\text{g/mL}$) 的模拟透析液样品。考察方法的日内和日间精密度 (RSD) 和准确度 (RE), 见表 1。

3.4 提取回收率

取空白血浆 200 μL , 按“3.2”项下方法操作,

表 1 透析内液及透析外液测定的准确度和精密度结果

Table 1 Results of precision and accuracy tests

样品	浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	RE/%	RSD/%	
			日内	日间
血浆	0.3	3.8	6.7	5.4
	1.5	-2.7	4.7	4.2
	12.0	2.3	2.2	1.7
透析外液	0.1	-1.6	5.4	6.8
	0.5	5.2	1.0	3.2
	5.0	3.8	0.9	1.5

配制成低、中、高 3 个质量浓度 (0.3、3.0、12.0 $\mu\text{g/mL}$) 的标准样品, 每个浓度 3 个样本, 分别测定 DPDCT 的峰面积。以 DPDCT 的峰面积与相应浓度的 DPDCT 标准溶液直接进样的色谱峰面积之比计算样品的绝对提取回收率。结果表明, 3 种浓度下 DPDCT 在血浆中的平均提取回收率分别为 98.6%、97.9% 和 95.4%, RSD 分别为 2.0%、3.4% 和 0.3%。

3.5 稳定性

取空白血浆 200 μL , 按“3.2”项下的方法操作, 配制成低、中、高 3 个质量浓度 (0.3、3.0、12.0 $\mu\text{g/mL}$) 的 DPDCT 血浆样品。考察样品预处理后室温放置 4 h 和 $-70\ ^\circ\text{C}$ 下放置一周的稳定性。结果表明血浆样品在室温放置 4 h 和 $-70\ ^\circ\text{C}$ 下放置一周等条件下稳定性良好。

3.6 平衡时间

在透析袋内以透析外液代替血浆, 按“2.4”及“2.3”项下操作, 测定 4、6、8、10、12 h 时透析袋

内与透析袋外的浓度,以两者浓度之比对时间的关系考察透析袋内外的药物平衡时间。结果表明DPDCT透析达到平衡时间约需8 h。

3.7 透析膜对药物的吸附作用

将透析袋内加入1 mL(设体积为 V_1)空白透析液,然后在透析袋外加入已知药物浓度 C_A 的透析液20 mL(设体积为 V_2),在37℃恒温培养箱中放置8 h至其平衡后,测定透析袋外药物浓度 C_E 。透析膜对药物的吸附率 X 用下式计算^[4]。

$$X = [C_A \times V_2 - C_E \times (V_1 + V_2)] / C_A \times V_2$$

由测定结果可见,透析膜对药物有微量的吸附,低、中、高(0.2、1.0、5.0 $\mu\text{g/mL}$)3种质量浓度下吸附率分别为0.7%、1.2%、1.1%,透析膜的吸附作用对测试结果无影响。

3.8 血浆蛋白结合率的测定

结果低、中、高3种质量浓度(0.2、1.0、5.0 $\mu\text{g/mL}$)的DPDCT血浆蛋白结合率分别为(58.9 $\pm$ 2.0)%、(57.4 $\pm$ 1.2)%和(58.6 $\pm$ 0.8)%。见表2。

表2 DPDCT血浆蛋白结合率的结果
Table 2 Results of plasma protein binding rate of DPDCT

DPDCT/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	DPDCT/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		蛋白结合率/%
	透析外液	透析内液	
0.2	0.16 $\pm$ 0.01	0.39 $\pm$ 0.02	58.9 $\pm$ 2.0
1.0	0.74 $\pm$ 0.03	1.74 $\pm$ 0.05	57.4 $\pm$ 1.2
5.0	4.29 $\pm$ 0.08	10.38 $\pm$ 0.21	58.6 $\pm$ 0.8

对8 h的数据进行统计分析,应用 F 检验证明其方差齐性后,通过SASS软件进行方差分析,结果表明各浓度组间的结合率数据差异无显著性。

4 讨论

实验初期生物样品预处理方法的建立,是实验的关键问题,同时也是难点之一。选择蛋白沉淀剂时,发现采用甲醇作为蛋白沉淀剂并提取生物样品中的DPDCT和内标,方法可靠,提取回收率高,确定用甲醇蛋白沉淀法。在检测波长的选择上,将DPDCT与内标进样分离后,利用DAD检测器对其进行全波长吸收光谱扫描,DPDCT与内标最大吸收波长虽不一致,在220~240 nm之间两者均有较

强的吸收,选择228 nm为检测波长,在此波长下基线平稳,且噪声小,具有较高灵敏度。

血浆蛋白结合率的测定方法有平衡透析法、凝胶过滤法、超滤法和超速离心法等^[5],平衡透析法原理简单,操作方便,不需要贵重的仪器,是一种较为经典的血浆蛋白结合率测定方法,但它容易受到一些因素的影响。在本实验过程中透析液的pH值和离子强度都被严格控制;透析外液和内液的液面始终保持在同一水平以避免体积迁移的干扰;透析过程在密封环境中进行,可以减少由于液体蒸发带来的透析液浓度的改变;每次实验结束后都要检查是否存在蛋白泄漏,泄漏的样品务必作废;实验中还考察了温度为37℃时药物的稳定性和透析膜对药物的吸附作用,均符合要求。

本实验结果显示,HPLC法测定DPDCT与大鼠血浆蛋白结合率实验具有简便、快速、灵敏与选择性高的特点。DPDCT与大鼠血浆蛋白具有中等强度的结合率,在实验浓度范围内,蛋白结合率与透析液的药物浓度无关。由于体外实验条件不能完全模拟药物在体内的环境,因此体外实验结果不能完全代表药物的体内血浆蛋白结合率,该结果可作为体内真实血浆蛋白结合率的参考。

参考文献

- [1] 尚先梅,吴军,李青山.芳香异羟肟酸有机锡抗癌化合物的初步构效关系[J].中国科学B辑:化学,2008,38(5):429-440.
- [2] 李杨,张青青,孙惠斌,等.2-甲氧基雌二醇大鼠血浆蛋白结合率的测定[J].中国新药与临床杂志,2011,30(10):755-758.
- [3] 刘杨,林建阳,陈晓辉,等.白藜芦醇衍生物RT-B与大鼠血浆蛋白结合率的测定[J].中国新药与临床杂志,2008,27(6):403-406.
- [4] 高秀蓉,蒋学华,王婷.HPLC法测定蝙蝠葛碱与大鼠和人血浆蛋白的结合率[J].中国药房,2011,22(31):2894-2897.
- [5] 杜英峰,靳怡然,许慧君,等.冬凌草甲素在不同种属血浆中蛋白结合率的HPLC法测定[J].药物分析杂志,2012,32(3):383-387.