

稳定同位素在药物动力学研究中的新进展*

梁剑平^{1,2)} 卫增泉¹⁾ 张 力²⁾ 吴逢兴²⁾ 李 蓉³⁾

1) (中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

2) (中国农科院兰州畜牧研究所 兰州 730050)

3) (兰州药品检验所 兰州 730030)

摘 要 综述了稳定同位素在药物动力学研究中的最新发展,随着质谱和色-质联用等仪器的普及,它将成为药物研究中的一种重要手段.

关键词 稳定同位素 药物动力学 质谱

分类号 O615.3

稳定同位素(SI)在药物动力学^[1] PK (Pharmacokinetics)研究中的应用近年来急剧增加,已取得可喜的成果.其主要原因有:(1)将 SI 引入药物分子的手段及其原料日益增多,使许多 SI 在药物中的研究成为可能.(2)质谱和色谱联用技术的应用具有先分离,然后进行检测的特点.理论上,以待测物的稳定同位素标记物作内标最理想.它提高了药物的稳定性,定量的专一性和灵敏度,检测量一般为 ng,有的更低.有人认为,在其他范围内的突破[如多道排列检测器(Multi-channel array detector)]将使质谱的灵敏度达到 fg 水平.(3)SI 可直接用于生物个体作为示踪物,无放射性危害. PK 分析材料是生物样品,往往药物含量低、成分复杂、干扰因素较多;受试对象是动物和人,因此其无放射性危害及其精度高,使 SI 在 PK 研究中有广泛应用前景.本文就近年来的一些应用简述如下.

1 分析方法的应用

分析方法一般包括分离方法和检测方法两大部分^[2,3]. PK 研究中的分离方法通常有薄层层析(TLC)、气相层析(GC)和高效液相层析(HPLC)等.质谱仪 MS 作为检测方法,常用电子轰击(EI)和化学电离(CI)质谱.近

来,又有负离子化学电离质谱(NICI-MS)、场解吸质谱(FD-MS)、原子轰击质谱(FAB-MS)和质谱-质谱(MS/MS)等赋予应用.将内标物这些分离和检测方法有机组合,将为 PK 研究提供新的有效手段.

由于 GC-MS 接口技术解决较早^[4],故在上述方法中,GC-MS 最为常用.后来,将 GC 与 NICI-MS 联用,可增加某些化合物的检测灵敏度.如可乐定(Clonidine),检测下限达 10 pg/ml,褪黑激素(Melatonin),则能测至 pg 甚至 fg 水平. GC-MS 固然有许多优点,但它对易热解和挥发性低的药物却无能为力.商品化的 HPLC-MS 接口已有移动钢带式 and 热喷雾式供选用.最近,有人将热喷雾式 LC-MS 用于生物体内胆碱和乙酰胆碱的定量研究.随着接口技术的不断完善, HPLC-MS 在药物分析领域中将起重要作用.有些药物经衍生化用 CG-MS 分析,灵敏度不高,如抗癌药 PCNU [1-(2-卤乙基)-3-(2,6-2氧代-3-哌啶基)-1 亚硝酸].改用 TLC 分离后,用 NICI-MS 定量,可避免 GC-MS 的热解,最低可测至 1 ng/ml.

TLC 独到之处是能分离有极性的不易挥发的和易热解的样品.但用 MS 检测这类药物时,却遇到不少麻烦:(1)EI、CI 和 NICI 电离方法要求样品能够挥发而不分解;(2)从

* 1997 - 08 - 25 收稿, 1997 - 12 - 22 收到修改稿.

TLC 分离后的样品必须转入质谱仪. 其手段为: (1) 从 TLC 载体上用溶剂洗脱样品, 浓缩后进入离子源, 但很可能会影响洗脱和带来污染问题; (2) 直接将 TLC 载体置入离子源, 但技术上难于解决.

近年来应用较多的软电离技术 FD, 样品不需要衍生化就可直接电离. 电离时产生的离子内能较低, 因而图谱碎片很少. 虽较易得到分子离子或准分子离子峰, 但操作较复杂. 本法主要用于分子量较大的不挥发性或易热解样品的定性分析, 定量研究尚不多, 如 TLC 与 FD 联用. 前者分离后的样品必须经洗脱浓缩后才能进入 FD 离子源. 与 FD 相似, FAB 也是一种软电离技术, 用于有极性、不挥发性和易热解样品的分析. 操作较 FD 简单, 重现性也好, 它要求样品有一定极性和较高分子量 (一般大于 400), 更可取的是可以直接将吸附样品的 TLC 载体置于 FAB 离子源.

Gaskell 等人以氘类似物作内标^[5], 生成样品经免疫吸附提取技术分离后, 将 FAB 直接用于测定脱羟基表雄甾酮磺酸盐的含量. 近年发展的串联质谱 (MS/MS) 技术用于复杂成分的分析, 很受注意. MS/MS, 是指样品分子在第一次电离产生分子、离子和碎片离子 (母离子) 后, 再对特征母离子进行第二次电离产生特征离子, 对子离子进行定性和定量分析. 利用 MS/MS, 以氘代华法林为内标, 分析血浆华法林的浓度, 省去了样品的纯化和衍生化, 整个过程仅需 2 分钟. 最近, 又采用 TLC-MS/MS 定量分析尿中羟基化的非那西定 (NHP). 先用 TLC 预分离含 [²H₄] NHP 内标准的尿样, 再用 MS/MS 定量. 此法避免以前使用的 GC-MS 法热解, 从而提高了分析精度. GC-MS/MS 用于 PK 的事例也有报道. 显而易见, MS/MS 特别适用于复杂成分的分析, 专一性更高, 它对分离要求不高, 因而快速而简便, 若与其它分离方法联用, 将使其应用范围大为扩展.

NMR 主要用于药物结构测定, 在代谢

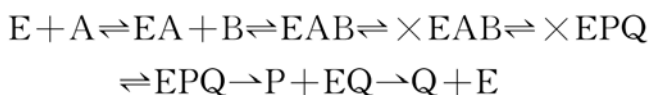
研究中具有独特的优点, 应用也较多. 红外光谱、电子自旋共振和拉曼光谱也可用于 SI 分析, 但实例则甚少.

2 药物代谢研究中的应用

进入生物体内的药物往往大部分转化为代谢产物^[6], 以往的研究常用放射性同位素, 但应用于人体, 其剂量会超过安全限度, 所以过去用放射性示踪物所获数据多来自动物实验. 然而, 药物在人体内的代谢、分布、更新速度、清除率等都与动物的不完全相同. 鉴于 SI 的特点, 使其成为人体代谢研究的有力工具.

通常, 将化合物原子被 SI 取代所引起反应速率的改变称为 SI 效应, 氢 (H) 和氘 (D) 在质量上不同, 使 C-D、O-D 和 N-D 键的振动频率较相应的 C-H、O-H 和 N-H 低, 断裂稳定的化学键需要更多的能量. 所以在 H 被 D 取代时, 化学键断裂的反应速率往往减慢. 一般 K_H/K_D (K_H 和 K_D 分别为 H 和 D 化合物键断裂的反应速率常数) 的比值在 2~5 之间, 但最大效应也可达 7~10, 称为次级 SI 效应. 氘也可以影响非氘化学键断裂的反应速率, 例如三氘代甲基醚的水解, 其 K_H/K_D 值通常为 1~2. SI 效应也可在 ¹³C、¹⁵N 和 ¹⁸O 中产生, 但总的影 响很小, 故可忽略不计, 所以通常 SI 效应系指氘同位素效应 (DIE). 芳环化合物氧化物继而重排成酚, 脂烃化合物或其某一部分氧化 (首先在烷烃基团上去氢), 然后羟基化. DIE 往往发生于后一种反应类型.

药物代谢最主要的反应是由红细胞色素 P-450 酶系引导^[7], 这种酶催化过程很复杂, 其过程可由下式表达



E 为酶; A 和 B 为底物或为底物和协同因子; P 和 Q 为产物; \times 表示活化态. 每一步骤均可能有 DIE 产生. $\times EAB = \times EPQ$ 是指

体内氘同位素效应. 其与化学反应 DIE (D_K) 类似. 尽管 D_K 值有时可达 10~15, 但对反应的影响仍受上述连续过程所制约, 使观察到的 DIE ($D_V = K_H/K_D$) 相当低, 例如发现, 7-乙氧基香豆素及其 [$^2\text{H}_3$] 衍生物, 在鼠肝微粒体纯化的 P450(苯巴比妥诱导) 和 P448(甲基胆蒎诱导) 的催化下, 脱乙基化的 D_K 值均为 12. 但 D_V 值却分别为 3.8 和 2.

评价氘代药物的 DIE, 有体外法和体内法两种. 体外法一般将氘代药物与肝微粒体共同温育, 观察氢与氘药物消失的相对速率 (K_H/K_D) 或者相应代谢产物形成的相对速率, 以此来决定 DIE 值的大小. Begue 于 1983 年提出了一种新的用于药物动力学的系统, 将大鼠上皮细胞共同培养, 可以保持较长时间的代谢活性, 从而弥补用人离体肝细胞培养的存活期仅 3~6 小时的缺点. 此方法在 DIE 评价中有实用意义.

3 立体选择性研究中的应用

药物的立体选择性是既古老而又现实的问题. 临床使用的药物, 尽管常假定为单一的化合物, 但往往是 50:50 的光学异构体的混合物. 其中仅有一种有治疗作用. 而另一种无活性的异构体则称为不纯物, 有时有药物的副作用. 药物的立体选择性或与药物-受体相互作用有关, 或与制剂的药效学有关, 而药效学的不同往往是由于 PK 的差异所引起. 例如, 代谢转化速率、代谢转换途径和转动过程, 包括特定组织的摄取、储存和排泄等. 因此, 研究药物异构体的 PK 规律非常必要. 有助于 SI 标记 (+) 和 (-) 假消旋体, 可避免以前研究同类问题需要多次给药的缺点, 使结果可靠. 这种技术近年来已应用于临床常用药物.

4 定量测定的评价

4.1 准确度

准确度是真值与实测值相符程度的量

度. 准确度可由所得数据与公认为准确的参考方法所得的数据(真值)进行比较而获得, 而且可校正所得的药物损失而获得. 无疑, 与待测物最相象的内标对药物的损失能够提供最为精确而准确的补偿. 因而, 就物理性质而言, SI 与待测物最近似.

质谱定量一般是基于实验样品的测定值与样品在相同实验条件下测定的标准样品值的比较. 如果实验样品中待测物的行为与掺样对照基质(一般是多个空白样品的混合物, 供加标准品作标准曲线)中待测物的行为不一样, 而且又缺乏有效的内标, 那么上述的比较也就不能准确补偿操作过程中存在的样品损失. 这种行为的不同可由代谢产物的存在和由个体当时的饮食或病情引起, 引用 Hildebrand 方程^[7]可以定量描述溶剂的选择和提取效率的关系. Hildebrand 溶解度参数和溶质(待提取物)相同的溶剂提取回收率最大. 由于 SI 与代测物在化学上极其相近, 因而 SI 作为内标的效能可能超过任何其它类型的内标.

4.2 精密度

精密度是一组数据在其平均值周围分散程度的量度^[8]. 如果定量测定有良好的精密度, 测定结果可能准确. Claeys 等人以马普替林 (Maprotiline)、 $[\text{}^2\text{H}_4]$ 丙米嗪、丙嗪及 $[\text{}^2\text{H}_4]$ Desimipramine 作内标测定^[7], 结果表明, 用稳定同位素标记物作内标, 对长期内的仪器不稳定和样品处理引起的误差产生最小的方差. Hodson 等人用 GC-MS 法测定 20 份唑洛芬度均为 200 pmol/ml 的样品, 其中 10 份以 SI 为内标. 结果分别为 193 ± 4 pmol (RSD = 2%) 和 2721 pmol/ml (RSD = 4%). Luthe 等人以 SI 的 GC 柱吸附的损失比近似物更接近扁桃酸.

麻醉药咪达唑仑 (Midazolam) 的电子捕获气相色谱 (EC-GC) 测定法及 GC-MS (负离子化学电离) 测定法均有报导^[2], 表 1 列出了两种测定方法的主要特征. 由此可见, 两种测定方法很相似.

为了便于比较, 取新鲜血浆数份分别加入咪达唑仑, 使血浆浓度分别为 2.1、3.6、8.4、16.2、36.0、120、180.0 ng/ml, 并用代号分别标记; 各在这两种方法的实验中重复测定 3 次. 结果比较见表 2. 由表 2 可见, 两种方法为等同 [EC-GC = 1.024(GC-MS) - 0.87 ng, 相关系数 = 0.993]. 但 GC-MS 法的总体平均相对标准差 ($RSD \pm SD$) 为 (5.0 ±

3.0%), 较 EC-GC 法 (11 ± 10%) 小得多, 对低浓度的差异更为明显. 由于两种方法的实验步骤类同, 而 EC-GC 法的信噪比大于 GC-MS 法. 专属性对加入的样品杂质的质量数切换肯定还会影响 EC-GC 检测过程中的精密度. 由此可见, 以 SI 为内标可得到最佳的定量测定精度.

表 1 咪达唑仑 EC-GC 和 GC-MS 测定法的比较

	EC-GC	GC-MS
血浆容量、pH 及溶剂	1 ml、pH9 及苯-甲醇-丙酮 (17:1:2)	1 ml、pH10 及苯-1、2-二氯乙烷 (80:20)
GC 柱	3% Poly S-176、80~100 目 Chromo-sorb W 载体	3% SE-30、100~120 GCQ 载体
柱温	265°C	260°C
内标	氟硝西洋	[² H ₅]咪达唑仑
标准曲线的浓度范围	2~200 ng/ml	2~60 ng/ml
精密度	66.6%	6.8%

表 2 EC-GC 和 GC-MS 重复测定三次同一样品的结果

浓度 (ng · ml ⁻¹)	EC-GC/ng · ml ⁻¹ (RSD%)	GC-MS/ng · ml ⁻¹ (RSD%)
180.0	183 ± 3.0 (1.6)	117 ± 6.0 (3.3)
120.0	111 ± 13 (12)	113 ± 1.7 (1.5)
36.0	33.2 ± 1.1 (3.3)	35.7 ± 0.5 (1.4)
16.2	14.7 ± 0.8 (5.4)	15.4 ± 1.0 (6.5)
8.4	7.3 ± 0.2 (2.7)	8.2 ± 0.6 (7.3)
3.6	4.0 ± 1.1 (28)	3.2 ± 0.3 (9.4)
2.1	2.7 ± 0.6 (22)	1.7 ± 0.1 (5.9)
平均 RSD ± SD	11 ± 10%	5.0 ± 3.0%

4.3 专属性

专属性反映测定方法排除非测定物对测定产生干扰的程度. 理论上称为保留时间和峰检测干扰. 由于这些参数随同进样的其他物质的性质和数量而改变, 故很少利用. 近年来, 美国 GARLAND WA 实验室为了收集和分析药物动力学研究中所获得的选择性离子检测 (SIM) 数据^[8], 专门设计发展了一

种计算机软件和硬件系统 (QSIMPS), QSIMPS 使用 SI 作为待测物的保留时间和峰性的参比物.

4.4 QSIMPS 工程流程

- (1) 内标和待测物各采集 512 个数据点;
- (2) 计算基线并减去亚基线;
- (3) 在特定的时间窗口内查找内标峰;
- (4) 将时间拟合多项式函数以计算大致的峰高和保留时间;
- (5) 用 EMG 函数计算峰高和保留时间;
- (6) 重复 2~6 次, 用 SI 的保留时间查找待测峰, 用内标峰拟合产生的 S 、 R 和 T 值并作为待测峰;
- (7) 计算离子强度比.

QSIMPS 工作时, 先将 SI 数据拟合 EMG. 最近, 已证实此模型最能代表色谱性能的特点. QSIMPS 使用的 EMG 方程为

$$h(t) = \frac{AS}{T} \left[\frac{\pi}{2} \right]^{\frac{1}{2}} \times \exp \left[\left(\frac{S}{T} \right)^2 \times \left[\frac{1}{2} - \frac{t-R}{T} \right]^2 \right] \times$$

$$\int_{-\infty}^{Z^{-\frac{1}{2}}} \frac{1}{(2\pi)^{-\frac{1}{2}}} \exp \frac{y^2}{2} dy ,$$

$$Z = 2^{-\frac{1}{2}} \left[\frac{t-R}{S} - \frac{S}{T} \right] ,$$

式中, $h(t)$ 为 t 时间的峰高, A 为高斯曲线的峰高, S 为高斯曲线的方差, T 为指数衰减常数, R 为高斯曲线的重心.

将 SI 的 SIM 数据拟合 EMG 模型时所得到的 R 、 S 和 T 值作为样品峰对应项的初始值似合样品峰和 EMG 模型. 在一定的时间窗口内, 将最大的峰识别为 SI, 将样品峰识别为与 SI 一同洗脱的峰. 因而 S 、 R 和 T 值仅限于表征 SI 峰形和保留时间的一定范围内. 在此特定范围以外的观察值必须重新测定.

根据应用 QSIMPS 分析上述咪达唑仑的 GC-MS 测定结果, SI 可以成功地降低保留时间的变异性. 咪达唑仑样品的值相对标准差为 10.3%, 但如果对内标归一化, 即降到 1.4%, 同样 1-羟甲基咪达唑仑样品的值相对标准差为 2.1%; 若对 SI 归一化则降到 0.6%, SI 对 S 和 T 值的变异性影响就很小.

参 考 文 献

1 Yoshiko Shinohara, Minoru Fujioka, Shigeo Baba.

- Pharmacokinetic Studies of Testosterone Propionate Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry/Selected Ion Monitoring. *Biomed Mass Spectrometry*, 1988, 16(8): 241~244
- 2 Yasuji Kasuya, Takashi Funita, Noriko Hirota. Determination of Cortisol in Human Plasma by Stable Isotope Dilution Mass Spectrometry. *Biomed Mass Spectrometry* 1988, 16(9): 309~311
- 3 Burlingame A L. *Mass Spectrometry*. *Anal Chem*, 1996, 68: 599R~651R
- 4 Gilpin R K, Pachia L A. *Pharmaceuticals and Related Drugs*. *Anal Chem*, 1995, 67: 295R~313R
- 5 Favier Jan Paul, Bicanic Dane. Detection of Total Fatty Acids Content in Margarine: An Intercomparison Study of GLC, GLC+TLC, FT-LR and Optothermal Window. *Anal Chem*, 1996, 68: 729~733
- 6 Schubert Jan. Volatile Organic Compounds Determined in Pharmaceutical Products by Full Evaporation Technique and Capillary Gas Chromatography/Ion-trap Detection. *Anal Chem*, 1996, 68: 1317~1320
- 7 Kimber, Rundlett, Daniel W. Mechanism of Signal Suppression by Anionic Surfactants in Capillary Electrophoresis-electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Armst Anal Chem*, 1996, 68: 3493~3497
- 8 Platzner I, Deganl N. Fractionation of Stable Calcium Isotopes in Tissues of Date Palm Trees. *Biomed Mass Spectrometry*, 1990, 19(13): 822~824

Recent Progress of Stable Isotopes Study on Pharmacokinetics

Liang Jianping^{1,2)} Wei Zenquan¹⁾ Zhang Li²⁾ Wu Fenxing²⁾ Li Rong³⁾

1) (*Institute of Modern Physics, the Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000*)

2) (*Lanzhou Institute of Animal Science, the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050*)

3) (*Lanzhou Institute of Drug Control, Lanzhou 730030*)

Abstract The recent progress of the Stable Isotopes(SI) research on pharmacokinetics is reviewed. With development of MS and GC-MS, it will be an important method for studying drugs.

Key Words SI pharmacokinetics MS