

• 综述 •

血浆中游离药物浓度分析方法的研究概述

闫宇航,王佳琪(综述),周春华*(审校)

(河北医科大学第一医院临床药学部,河北 石家庄 050031)

[摘要] 药物进入人体循环后,以游离型和结合型两种形式进行转运和储存,两者处于动态平衡,只有游离型药物才能跨膜转运及发挥药理活性,而结合型药物会以体内储存的形式暂时失去药理活性,因此药物在血液游离浓度的高低是其疗效好坏的关键。为实现个体化治疗,在越来越多的临床情况中,测定药物的游离浓度愈发重要。药物的游离浓度受到多种因素影响,如年龄、性别、血浆白蛋白水平、药物相互作用等。目前测定药物游离浓度的方法很多,有传统的方法如平衡透析法、超滤法等,也有新兴的方法如中空纤维离心超滤法、快速平衡透析法等。每种测定方法都有其固有的优缺点,而针对不同特性的药物采取不同的测定方法往往才能获得准确的分析结果。本文综述了9种经典且目前常用的方法,并重点介绍了每种测定方法的原理、适用范围以及优缺点。

[关键词] 血药浓度;蛋白质结合;药代动力学;治疗药物监测 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2025.03.020

[中图分类号] R284 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2025)03-0366-08

在人或动物血液中,药物存在与血浆蛋白结合和游离两种形式,其中游离药物发挥药理活性^[1]。而血浆中游离药物浓度是由血浆蛋白结合率决定的,因此在药物研发的早期阶段确定血浆蛋白结合率是非常重要的。此外,在个体化医疗和治疗药物监测中,测定药物的游离浓度是更有意义的。药物的血浆蛋白结合率对临床药代动力学和药效学之间的定量关系有重要影响。因此,准确测定游离血浆药物浓度对于了解药物作用是很重要的^[2]。有许多方法可用于测定血浆蛋白结合的程度与游离药物浓度,但用不同的方法测定相同浓度水平的相同化合物所得的结果范围却相对有所不同,其精确度与敏感度亦存在差距,出于这个原因,选择敏感度高,选择性好和更加快速的分析方法测定药物的游离浓度及其血浆蛋白结合率尤为重要。本文综述了几种重要的测定血浆中游离药物浓度和蛋白结合率的分析方法,并概述和讨论每种方法的原理以及固有的优缺点。

1 游离药物分析常用方法

1.1 平衡透析法(equilibrium dialysis, ED)

ED是基础研究中最常用的测定血浆蛋白结合率的方法。

法。并被认为是“金标准”^[3],经常被用作其他方法的参考技术^[4]。该方法采用透析池,在透析池中间用半透膜隔开形成两个储液室。半透膜具有分子筛的作用,相对分子质量较小的游离药物分子可以通过膜,而将蛋白质和药物-蛋白复合物截留在血浆或血清样本中。在该方法的实验操作中,将等体积的分析物(含药血浆或血清)和空白缓冲溶液分别放置于透析膜的两侧,然后在生理温度(37℃)下给予足够的时间使待分离药物通过半透膜,在缓冲液和血浆或血清样本中实现平衡分布^[5]。达到平衡时,血浆或血清样本中的游离药物浓度和缓冲液中相等,此时测定缓冲液中待测物的浓度就可以反映半透膜另一侧血浆或血清样本中的游离药物浓度。分别从血浆和缓冲液两侧取等量溶液计算血浆蛋白结合率与药物的游离分数。由于是等量溶液所以无需进行体积校正。

达到平衡的时间是平衡透析中的一个重要变量^[7]。为使该方法有效,缓冲液和血浆隔室中的未结合药物必须处于平衡状态。因此,应进行预实验以确定达到平衡的时间。为此,可在实验中分析缓冲液和血浆浓度在不同时间段的变化情况。当在几个时间点之间未检测到血浆和缓冲液浓度的变化时,即达到平衡。不同的透析池大小与体积不同,透析池的表面积与体积之比会影响达到平衡的时间。表面积/体积大的透析池比表面积/体积小的透析池更快达到平衡。此外,旋转或搅拌透析池也会缩短达到平衡的时间,目前有研究建立了动力学模型来

[收稿日期]2024-07-09

[基金项目]河北省自然科学基金(H2022206548)

[作者简介]闫宇航(2000-),男,河北石家庄人,河北医科大学第一医院理学硕士研究生,从事临床药学研究。

*通信作者。E-mail:zhouchunhua@hebm.u.edu.cn

预测达到平衡的时间^[8],这有效地提高了平衡透析的效率。

在平衡透析实验中,为了获得准确的结果,必须控制许多变量。血浆 pH 值应调整到生理 pH 值(7.4),因为血浆蛋白结合与 pH 值有关。由于平衡透析是一种体外技术,所用缓冲液在生理学上与血清不同。缓冲液中的离子可能影响药物与血浆蛋白的结合。克服该问题的一种方法是使用由过滤的血浆制备的血浆水。然而,这需要更大体积的血浆。受血浆蛋白渗透压影响,液体可能会从缓冲液室转移到血浆室。这导致血浆蛋白被稀释。如果需要,可以加入葡聚糖改善缓冲液的等渗性,从而对抗渗透液的变化。或者,通过数学校正因子校正液体变化。

由于测定是在浓度平衡状态下进行的,因此 ED 被认为是最可靠的血浆蛋白结合率测定方法,测定结果最能体现真实浓度^[9]。并且平衡装置相对经济便宜,平衡透析膜也比较常见。ED 应用范围也较广,既适用于小体积样品,也适用于大体积样品。

然而,ED 存在一些缺点^[7],如平衡时间较长,一次能测定的样品量少,不适合测定血浆稳定性差和吸附性强的药物。但快速平衡透析(rapid equilibrium dialysis,RED)仪^[10]的出现极大程度改善了这一问题,由于存在涡旋力,扩大了透析面积,使预处理和透析时间缩短,能够使平衡透析时间从 24 h 缩短至 4 h。与传统 ED 不同,RED 在透析膜两侧,即血浆样品侧和缓冲液侧所加入的试液体积不同,这可以排除药物吸附的问题,故适合于吸附性强和血浆稳定性差的药物。RED 装置一次可分析 48 个样品,透析时间也大幅缩短,解决了测定样品量少的问题;并且这种透析膜已经批量生产,试验的温度和 CO₂ 浓度固定,故其重现性较好。其缺点为设备的价格比较昂贵。目前在 RED 的基础上发展出了小容量 RED^[11],对于接触体积小和蛋白质浓度低的生理液体也可以完成精确测定。此外 ED 还有体积转移导致血浆中蛋白被稀释及药物与膜存在非特异性吸附等问题。

1.2 离心超滤法(centrifugal ultrafiltration, CF-UF) CF-UF 是一种快速、有效且简单的游离药物浓度测定技术,是将游离药物与结合药物分离的主要方法。使用该技术时,将血浆样本放入超滤装置中(这种装置市场上有售,由 2 个由过滤膜隔开的容器组成);超滤装置中存在超滤膜,超滤膜有特定的分子截留值,允许血浆水和相对分子质量较低的化

合物通过。实验时将样本放置在超滤膜样品侧,在离心力的作用下游离药物进入超滤膜另一侧,而蛋白结合药物则留在样品侧^[6]。

该方法的优点是不需要使用非生理缓冲液进行蛋白质结合测量。还可以应用于不同类型的生物基质,包括组织匀浆。相较于超速离心机,超滤膜装置更容易获得,价格也相对便宜;样品制备时间较短,一次 20 min 左右,所以适用于大量样品测试。

然而,这种方法面临着非特异性吸附和浓度极化等问题,在分离过程中,样品中小分子成分不断通过膜,而大分子成分则被截留保存在样品室。因此,在膜表面附近会形成一层浓缩溶质层(边界层),随着大分子成分在膜表面逐渐堆积,浓度越来越高,从而形成自下而上的浓度梯度,这种现象被称为浓度极化。浓度极化会导致流速下降,超滤膜的选择透过性变差从而使分离的速度逐渐减慢。中空纤维离心超滤(hollow fiber centrifugal ultrafiltration, HF-CF-UF)技术是克服浓度极化现象的新选择。

有研究^[12]指出,超滤液与样品溶液的体积比(V_u/V_s)会影响 CF-UF 的准确性,不同的血浆条件存在不同的 V_u/V_s 值。例如患者的血浆蛋白浓度与健康受试者不同,并且在不同疾病和合并用药的患者之间也存在显著差异。据报道^[13],血浆白蛋白浓度会影响药物的蛋白结合,并进一步导致游离药物浓度的变化。 V_u/V_s 越大,得到的游离药物浓度越大,因此只有 V_u/V_s 应尽可能小,才能最小程度的破坏药物与蛋白结合平衡,但是目前的 CF-UF 还不能准确的控制 V_u/V_s 。为解决这一问题,有研究^[13]以丙戊酸(valproic acid, VPA)为代表药物,分别采用 CF-UF 和 HF-CF-UF 分离不同白蛋白浓度的血浆样品。研究了不同白蛋白浓度对人血浆中游离药物分析的影响。该研究观察到游离 VPA 浓度随白蛋白浓度降低而增加,在一定浓度范围内与 CF-UF 相比, HF-CF-UF 测定的游离药物浓度差异无统计学意义。然而,在低白蛋白浓度下观察到显著差异,并且该差异随着白蛋白浓度的降低而增加。在研究类似问题时, Tang 等^[14]使用离心超滤-高效液相色谱-串联质谱法定量测定游离仑伐替尼浓度时,显示离心力和离心时间对 V_u 有显著正向影响。

$$\text{根据公式 } C_f = \frac{K}{C_p} \cdot \frac{V_u}{V_s} \cdot C_u + C_u$$

其中 C_f 和 C_u 分别为 CF-UF 法获得的游离药物浓度和实际游离浓度; C_p 为血浆蛋白浓度; V_u/V_s 为超滤液与样品溶液的体积比; K 为与药物结合

能力相关的常数。

可以看出当 C_p 一定时, V_u/V_s 是影响 C_f 的唯一因素, V_u/V_s 值越小, 测定的游离药物浓度越接近实际游离浓度。据报道, V_u/V_s 最好为 20%, 20%~35% 也是可接受的, 以最大限度地减少血浆蛋白结合平衡的变化, 而 HFCE-UF 的 V_u/V_s 仅有 8% 左右, 并且可以更好地控制。相比之下, HFCE-UF 能得出更准确的结果。

1.3 HFCE-UF HFCE-UF 是近年来发展起来的一种从复杂基体中分离大分子物质的重要技术。HFCE-UF 装置是由玻璃管和 U 型中空纤维组成。离心后将滤液从中空纤维中抽出, 装入注射器, 然后将一定量的滤液直接注入高效液相色谱仪中进行分析。其基本原理与传统超滤相似, 在离心过程中, 小分子可以通过膜, 而大分子则无法通过。但两者离心机制是不同的, 对于传统的 CF-UF, 离心力的方向垂直于超滤膜, 超滤液被迫进入超滤液室^[6], 因此样品溶液总是受到浓度极化的影响。在浓度极化过程中, 会形成一个具有黏性的大分子层, 该层会进一步干扰小分子物质的过滤, 迅速降低过滤速度, 甚至堵塞膜。为了克服浓度极化, 通常采用稀释的方法。但稀释会导致浓度下降。而对于 HFCE-UF 来说, 离心力的方向完全平行于膜, 在这种条件下, 小分子可以自由移动, 因此内部和外部的分析物浓度相同, 这样就避免了浓度极化现象^[15]。

而且相比于传统的 CF-UF, HFCE-UF 的超滤液体积可以通过调整插入血浆样品中 U 型中空纤维的内部容量来实现更好的控制, 这使测量结果更准确^[16]。HFCE-UF 作为一种更为直接准确的测定方法, 已成功应用于药物动力学研究, 目前已常用于联用超高效液相色谱法测定抗生素^[17] 已经精神类药物^[18] 的游离浓度。该方法具有精密度高、准确性好、检出限低、回收率高等优点, 优于以往的分析方法。需要注意的是超滤的效率与离心力有关, 为了获得最高效的过滤, 需要对离心力进行优化。有文献^[19] 通过混合空白人血 200 μL 、2.0 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH = 2) 25 μL 和含有头孢克洛 (1.92 mg/L) 和内标头孢拉定 (1.90 g/L) 的溶液 25 μL 制备样品。分别在 6 000、8 000、10 000 和 12 000 r/min 下过滤 10 min。结果表明, 离心力过小会导致滤液体积过小, 离心力过大会损坏中空纤维。因此, 10 000 r/min 是实验的最佳速度。

1.4 超速离心法 (ultracentrifugation, UC) UC 是最常见的无膜技术。其具体操作为将血浆样品放于专用的离心管中, 用超速离心机于 100 000 g、37 $^{\circ}\text{C}$

离心 15 h。离心后取上清液测定。在强大的离心力下, 游离药物、蛋白质分子与药物-蛋白复合物由于沉降系数不同而停留在液体介质中不同的位置, 相对分子质量大的蛋白质和药物蛋白复合物会沉降到试管底部, 而相对分子质量较小的游离药物则留在上清液中, 以此达到分离目的^[16]。该方法操作步骤简单, 且样品不通过任何膜, 仅存在于离心管中, 所以不存在样品吸附问题, 可以避免药物与膜的非特异性结合。其缺点为要求血浆样品稳定, 超速离心机昂贵, 难以获得, 且离心的样品数量较少 (每次只能离心 10~24 个左右样品), 离心时间也较长。

1.5 微透析法 (microdialysis, MD) MD 作为一种可靠的体内检测技术, 可用于在线测定动物和人体内几乎每一个特定的组织和器官间质药物浓度, 并且该技术具有定量特性。MD 是一种基于交换当量的方法, 用于分析游离药物浓度的系统由微量注射泵、微透析探头、微量组分收集器和观察笼组成。将具有透析作用的微探针置于待采样的生物组织内, 以恒定的流速将灌注液泵入内部管道, 存在浓度差的条件下, 游离药物通过透析膜进入探针内, 并被连续流动的灌注液不断带出, 即可得到特定区域中目标物质的准确含量^[22]。

MD 以透析原理为基础, 具体的工作机制是探针膜的截留相对分子质量始终小于大多数蛋白质, 因此只有游离药物才能扩散到透析液中^[21]。传统取样一般是采血后进行体外分析, 整个过程费时费力, 并且不能动态捕捉到药物在体内瞬时变化的全过程, 从而无法进行自身对照。相较于传统取样方式, MD 可在基本不干扰生物体生命条件的情况下, 对靶部位细胞外液中游离内源、外源性目标分子进行在体、实时和在线取样。正因为如此, 微透析样品避免了复杂耗时的样品制备过程, 可以直接进行在线分析^[22]。有研究^[23] 给猪注射一定剂量的万古霉素和美罗培南, 通过静脉微透析与标准血浆采样法监测万古霉素和美罗培南血药浓度, 并进行比较, 证明了 MD 适合进行连续采样的优点。MD 已是目前连续监测各种组织中抗生素浓度的首选方法。虽然 MD 是一种强大的采样工具, 但它有其固有的局限性。主要限制是优选亲水性药物。亲脂性药物通常会与探针的膜结合, 从而影响回收率。此外, 相较于无法通过膜的相对分子质量较大的药物, MD 更适合分析相对分子质量小的药物^[27]。目前 MD 已经广泛用于药代动力学与代谢组学的研究中。

1.6 固相微萃取法 (solid-phase microextraction, SPME) SPME 是一种无溶剂样品制备技术。与

其他样品制备技术相比,SPME 相对快速、简单易用且易于自动化。

其提取化合物的原理是基于游离分析物(未结合)在固体吸附剂和样品基质之间的分配平衡^[24]。SPME 用于从样品基质中提取目标分析物时,可以使用顶空(head space, HS)模式^[25]或直接浸没(direct immersion, DI)模式。在 DI 模式下,SPME 纤维(吸附剂相)直接浸入样品血浆中,待测物会在样品和纤维间达到吸附平衡。要在 DI 模式下加速提取,可以采用搅拌、样品流动等技术。DI-SPME 主要适用于非挥发性的极性分析物。在 HS-SPME 模式中,SPME 纤维作为顶部空间放置在样品上方的气相中。与 DI-SPME 不同,HS 模式仅适用于提取挥发性化合物。提取结束时,将纤维转移至气相色谱或高效液相色谱进行分析^[31]。由于通过 SPME 提取的药物量与其在血浆/基质中的游离浓度成正比,因此该方法可用于确定血浆蛋白结合的程度和其他相关参数。

此前已经报道了几项应用 SPME 进行的蛋白结合性研究。第一项此类研究由 Musteata 和 Pawliszyn 进行^[26],他们应用 SPME 测定了地西洋(diazepam, DIA)(一种具有高蛋白结合特性的极性药物)和硝酸异山梨酯(一种具有低结合常数的非极性化合物)在人血清白蛋白中的结合曲线。从理论背景和三个理论与实践的具体途径进行了研究,以分析配体-受体(蛋白质)的结合和结合参数。研究显示,应用 SPME 测定了五种具有不同程度蛋白质结合特征的药物的血浆蛋白结合力。这项工作的结果表明,血浆 pH 值是影响重现性和蛋白结合的重要因素。

1.7 液相微萃取法(liquid-phase microextraction, LPME) LPME 与 SPME 原理大致相同,区别在于吸附剂形态的不同。SPME 采用固相吸附剂,而 LPME 采用液相吸附剂。液相微萃取的各种方法中,包括分散液-液微萃取、基于固相微滴的分散液-液微萃取、单滴微萃取、中空纤维液相微萃取、溶剂棒微萃取和电膜萃取^[27]。而从复杂生物流体(如血浆)中提取药物的方法主要有中空纤维液相微萃取、电膜萃取和 96 孔 LPME。平行人工膜分析法是另一种三相液-液萃取法,用一张平膜分隔两个水相区(供体和受体),并将有机溶剂置于膜孔中。膜萃取技术已被用于定量检测药物加标血浆中的游离药物,并通过膜平衡取样技术评估血浆样品中药物与蛋白质结合的程度。在所有这些方法中,化合物都是通过膜从供体室进入受体室的。

1.8 色谱法 相较于上述分离分析方法,色谱法精度高、速度快、效率高、应用范围广、容易自动化、可以兼容多种检测器,在研究药物-蛋白相互作用与测定游离药物浓度中具有一定优势。目前用于分析蛋白结合律和游离药物的色谱技术主要有高效亲和色谱法和毛细管电泳法(capillary electrophoresis, CE)^[28]。

1.8.1 高效亲和色谱法(high-performance affinity chromatography, HPAC) HPAC 的原理是将蛋白质靶点固定在色谱固定相表面,进样后,血浆样本中的药物分子与固定相上的蛋白质靶点发生相互作用,选择性的保留药物。检测药物分子的保留时间、峰面积等参数可以获得结合常数、解离速率常数,进而计算游离药物浓度。

应用 HPAC 时,最重要的是制备固定有目标蛋白的色谱固定相。由于所需要固定的目标蛋白的活性受到固定相载体和蛋白固定化方法的影响,选择合适的载体和固定化方法是固定成功的关键。目前最常用的固定相载体是二氧化硅,二氧化硅具有粒径分布均匀,热稳定性和化学稳定性好和机械强度高的优点。最常用的蛋白质固定化方法是共价偶联,其原理为利用载体表面修饰的功能基团与目标蛋白上特定氨基酸残基侧链形成共价连接,从而将目标蛋白固定在载体表面,这种固定方式效果稳定,但固定化过程中反应条件较为激烈,易影响蛋白的空间构象导致变性从而影响蛋白活性^[28]。

1.8.2 CE 在过去的几十年里,CE 技术因样品消耗少、分辨率高、分析时间短和容易自动化等优点,已成为非结合药物和药物与蛋白质相互作用测量的热门技术。在这方面常用的方法有亲和毛细管电泳(affinity capillary electrophoresis, ACE)、毛细管电泳-前沿分析法(CE with frontal analysis, CE/FA)、HummelDreyer 法(HD)、空位亲和毛细管电泳法和空位峰法^[29]。

在上述方法中,CE/FA 是研究药物-蛋白质相互作用最简单、最准确的方法。与色谱法相比,CE/FA 能够在接近生理条件下研究非共价相互作用。在 CE/FA 分析中,药物和蛋白质混合物在 CE 分析前进行平衡,然后将大量样品(一般为毛细管有效长度的 10%~20%)进样到充满缓冲液的毛细管中。由于进样量大,得到的是方形峰而不是窄峰。由于游离药物和药物蛋白复合物的电泳迁移率不同,因此会发生分离。根据方形峰的高度可获得游离药物浓度,因此可用于定量。然而,这种方法的主要缺点是敏感度低,使用紫外检测器时要考虑较低样品浓

度下的强相互作用^[30]。Wan 等^[31]在 CE/FA 基础上使用紫外和离子阱质谱检测器进行药物与蛋白质的结合测量。毛细管电泳与质谱联用法(capillary electrophoresis-mass spectrometry, CE-MS)所获得的结果与毛细管电泳紫外检测法(capillary electrophoresis with UV detection, CE-UV)所获得的结果相当,并且与文献报道的结果非常一致。

1.9 高效前沿分析 (high performance frontal analysis, HPFA) HPFA 采用限制进入型高效液相色谱柱,这类色谱柱具有排除大分子血浆蛋白而保留小分子药物的特性,选用温和的流动相(通常为生理 pH 值=7.4 的磷酸盐缓冲液,不添加任何有机改性剂)。实验时将过量体积的含有药物的血浆样品直接进样到 HPFA 柱中,在这种情况下结合药物从蛋白质中的释放被明显抑制,并最终在色谱柱顶部建立了微孔内的色谱分配平衡,同时建立了间隙中的药物蛋白质的结合平衡。此时,微孔内滞留流动相中的药物浓度与未结合的药物浓度相同,因此与初始样品中的药物浓度相同。然后,在色谱柱中产生未结合药物区,该区的药物浓度等于初始样品溶液中的未结合药物浓度,随后该药物区洗脱为梯形峰,最后形成平顶峰,平顶峰的峰高和峰面积分别对应于未结合药物浓度和药物总浓度。在分离过程中,药物-蛋白质结合平衡保持恒定,因为血浆蛋白结合是一个可逆且快速动力学的过程。

与传统方法相比,HPFA 具有几个优点,即无需任何预处理过程即可直接进样分析,操作比较简单,并且无需使用任何有机溶剂这更加环保,由于不使用透析膜,所以也避免了药物与膜相互吸附和浓度极化等问题。

Shibukawa 等^[32]使用该方法测定了吡喹酮、华法林、水杨酸盐、乙酰唑胺、卡马西平、酮洛芬和双氯芬酸等几种不同性质的药物的游离药物浓度与总浓度,并与传统超滤法进行比较,证实了 HPFA 的可靠性。并通过实验研究显示,HPFA 所需的最小进样体积(minimum injection volume, MIV)取决于多个因素。MIV 随未结合药物组分、药物容量因子或色谱柱长度的增加而增加。MIV 随结合亲和力或 HPFA 色谱柱理论板数的增加而减小。

1.10 其他方法 光谱法,光谱方法允许直接测量溶液内和真正平衡条件下的结合常数和药物浓度。这些方法是基于配体与蛋白质结合过程中蛋白质光谱性质的变化测定的。迄今为止,等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)、荧光、紫外-可见光、光学旋转色散(optical rotatory dispersion,

ORD)、圆二色性(circular dichroism, CD)、红外(infrared, IR)和核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)等方法已用于此目的。这其中用于研究药物显示中药物与蛋白质相互作用的 SPR 技术引起了许多研究人员的关注。SPR 生物传感器具有敏感度高、特异性强、实时性强和检测速度快等优点。

电化学法,电化学方法简单、快速、成本低、高通量。其中,伏安法在该领域的应用最多。Fotouhi 等^[33]通过玻璃碳电极上的循环伏安法(cyclic voltammetry, CV)和差分脉冲伏安法(differential pulse voltammetry, DPV)研究了呋喃唑酮(furazolidone, Fu)与牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)的相互作用。DPV 的峰值电流高度与具有电化学活性的未结合 Fu 浓度成正比。在 BSA 的存在下,会形成药物-蛋白质复合物,这种复合物不具有电化学活性,会降低峰值电流的高度。在蛋白质浓度恒定和药物浓度不同的情况下绘制校准曲线。该曲线用于计算药物的游离浓度和结合浓度。电化学方法的一个局限性,分析物必须是具有电活性的。

热量测定法,等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)和差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC)是研究药物与蛋白质相互作用的主要热量测定法^[34]。在 ITC 实验中,将药物滴定到含有相关蛋白质的溶液中,然后检测所产生或吸收的热量。由于每次向蛋白质样品中添加药物都会形成药物-蛋白质复合物,从而导致热量变化(释放或吸收),从而确定平衡结合常数。

此外, Yan 等^[35]引入“动态游离分数(dynamic free fraction, fD)”作为描述药物-蛋白结合动力学的新结合参数。并用九种模型药物证明,当使用血浆中药物的 fD 代替非结合分数(unbound fraction, fu)时,预测的肝脏提取率(衡量肝脏清除药物效率的指标)与观察到的提取率的相关性明显更好。同样,这些药物的体内肝清除率(衡量肝脏药物清除情况的指标)与用 fD 计算的清除率值非常接近,明显优于用 fu 计算的清除率值。

2 常用分析方法的最新研究进展

以上介绍了几种经典的测定游离药物浓度的方法,但随着对精准度的要求越来越高,这就需要经典方法进行优化以满足临床与实验室对于精密度和准确性的高要求。最近有研究^[36]对 RED 与质谱联

用(RED with Mass Spectrometry, RED-MS)进行了改进,通过单个透析数据集就能稳健地测量小分子与重组蛋白和复合物的结合亲和力,结果显示 RED-MS 计算出的亲和力与表面等离子体共振和亲和力选择质谱的测量结果有很好的相关性。该方法尤其适用于量化小分子与大型蛋白质复合物的结合,为测量血液中小分子药物提供了一种可行的选择。另外针对样本预处理与测定过程中容易出现的生物安全问题, Yang 等^[37]在 HFCE-UF 的基础上开发了一种全封闭 HFCE-UF,这是一种将密封技术与直接注射技术相结合的安全预处理装置,同时使用了几种细菌和病毒验证该装置的过滤效果,结果显示,该装置能有效阻断这些病原体,可以提高生物安全性,为技术人员提供有力保护。MD 由于其可以测定动物和人体内几乎每一个特定的组织和器官间质药物浓度,有研究^[38]针对该优势进行了探索,使用 MD 测定糖尿病足病变组织的抗生素浓度,结果具有不错的准确性,这为病变组织游离药物浓度的测定提供了新思路。

在 SPME 的研究中, Roy 等^[39]在材料和装置方面进行了改进,开发了一种塑料支撑式微量样品制备装置,由 96 针覆盖有少量与基质兼容的萃取相组成,对血浆中药物-蛋白结合进行高通量分析。该装置的塑料支撑结构因为化学稳定性高和表面光滑,可以最大限度地减少背景干扰的附着,因此特别适用于复杂的生物基质,如血浆和血液。并且该装置的 96 针结构能够从 96 孔板上直接采样,并且可以很容易地实现高通量采样的自动化。该装置的开发对于提高实验室效率具有指导意义。而在 HPAC 的最新研究进展中, Rodriguez 等^[40]使用包埋法解决了共价偶联在蛋白质固定过程中的蛋白变性问题,开发了一种在线纯化和截留系统,该系统可以从样品(例如血清)中提取蛋白质并将该蛋白质截留在小柱中,以用于高性能亲和色谱。其将人类血清白蛋白(human serum albumin, HSA)被用作模型蛋白。使用包含多克隆抗 HSA 抗体的免疫提取柱,以从应用样品中捕获和分离 HSA。随后,使用强阳离子交换柱重新捕获和聚焦从免疫萃取柱洗脱的 HSA。重新捕获的 HSA 被截留色谱柱中,该色谱柱包含酰肼活化的二氧化硅,并且存在氧化的糖原作为封端剂。该模型的药物结合常数与文献值吻合较好。在 CE 的研究方面, Vuignier 等^[41]对 CE/FA 联用的检测技术进行了优化,将电喷雾电离质谱法(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)法与 CE/FA 联用,研究了酸性、中性和碱

性药物与血浆蛋白的相互作用。与紫外检测相比, ESI-MS 检测的敏感度提高了 40 倍,而且还能评估紫外检测无法实现的药物与蛋白质之间的强烈相互作用。血浆蛋白结合(plasma protein binding, PPB)测量是放射性药物研究中开发正电子发射断层扫描(positron emission tomography, PET)放射性配体的关键步骤。目前的几项研究^[42-44]使用 HPFA 测量 PET 放射性配体的 PPB,显示相较于其他方法,由于 HPFA 没有特异性结合,可以在较短的时间内进行多次蛋白质结合测量,展现了 HPFA 在放射性药物开发中的优势。

3 小结和展望

本文介绍了几种药物游离浓度的分析方法与最新研究概况,总结了每个方法的原理与固有的优缺点。近些年来,游离药物浓度分析在临床研究中愈发得到重视,在临床治疗中应用的也越来越广泛。上述的方法是基于分离蛋白和药物测定游离浓度,探索一种尽量不破坏药物蛋白结合平衡的方法测定游离药物浓度显然是更准确的,虽然已有研究^[44]报道了在不破坏药物蛋白结合平衡的前提下同时测定药物总浓度和游离药物的方法,但尚不成熟,且没有投入临床治疗中。致力于探索一种全面的方法成为研究者未来探索的目标,这也将为解决临床实际问题提供更好的研究方向。

[参考文献]

- [1] Dasgupta A. Usefulness of monitoring free (unbound) concentrations of therapeutic drugs in patient management [J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 377(1/2): 1-13.
- [2] Dong WC, Song MY, Zheng TL, et al. Development of an hollow fiber solid phase microextraction method for the analysis of unbound fraction of imatinib and N-desmethyl imatinib in human plasma [J]. *J Pharm Biomed Anal* 2024, 250: 116405.
- [3] Metsu D, Lanot T, Fraissinet F, et al. Comparing ultrafiltration and equilibrium dialysis to measure unbound plasma dolutegravir concentrations based on a design of experiment approach [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 12265.
- [4] Rakhila H, Rozek T, Hopkins A, et al. Quantitation of total and free teriflunomide (A77 1726) in human plasma by LC-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 55(2): 325-331.
- [5] Wright JD, Boudinot FD, Ujhelyi MR. Measurement and analysis of unbound drug concentrations [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1996, 30(6): 445-462.
- [6] Seyfinejad B, Ozkan SA, Jouyban A. Recent advances in the determination of unbound concentration and plasma protein binding of drugs: Analytical methods [J]. *Talanta*, 2021, 225:

- 122052.
- [7] Zhang J, Pikul G, Horch J, et al. Enabling direct and definitive free fraction determination for highly-bound compounds in protein binding assay[J]. *J Pharm Biomed Ana*, 2021, 194: 113765.
- [8] Bae C, Chung G, Chung SJ. Prediction of the time to reach equilibrium for improved estimation of the unbound fraction of compounds in equilibrium dialysis using kinetic modeling[J]. *J Pharm Sci*, 2023, 112(11): 2901-2909.
- [9] 马智宇. 新剂型药物血浆中游离药物浓度研究方法概述[J]. *上海医药*, 2019, 40(7): 74-77.
- [10] Dimitrijevic D, Fabian E, Funk-Weyer D, et al. Rapid equilibrium dialysis, ultrafiltration or ultracentrifugation? Evaluation of methods to quantify the unbound fraction of substances in plasma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 651: 114-120.
- [11] Wiltschko L, Roblegg E, Raml R, et al. Small volume rapid equilibrium dialysis (RED) measures effects of interstitial parameters on the protein-bound fraction of topical drugs[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2023, 234: 115571.
- [12] 董维冲. 血浆中游离药物分析方法的理论与临床应用[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2014.
- [13] Zhang Z, Dong W, Yang X, et al. The influence of plasma albumin concentration on the analysis methodology of free valproic acid by ultrafiltration and its application to therapeutic drug monitoring[J]. *Ther Drug Monit*, 2015, 37(6): 776-782.
- [14] Tang T, Luo X, Li N, et al. A developed and validated centrifugal ultrafiltration coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for rapid quantification of unbound lenvatinib in human plasma[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2024, 1240: 124157.
- [15] Li JM, Li C, Jiang Y, et al. Pretreatment of plasma samples by a novel hollow fiber centrifugal ultrafiltrate device for the determination of cefaclor concentrations in human plasma[J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(44): 6824-6828.
- [16] 赵梦强. 治疗药物监测中药药浓度样品前处理关键问题研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2021.
- [17] Ren F, Liu Y, Li S, et al. Therapeutic drug monitoring of free vancomycin concentration in practice: A new analytical technique based on the HFCF-UF sample separation method[J]. *Biomed Chromatogr*, 2023, 37(3): e5559.
- [18] Wu X, Li H, Dong W, et al. Determination of free valproic acid concentration in 569 clinical samples by LC-MS/MS after hollow fiber centrifugal ultrafiltration treatment[J]. *Ther Drug Monit*, 2021, 43(6): 789-796.
- [19] Zhang L, Zhang ZQ, Dong WC, et al. Accuracy assessment on the analysis of unbound drug in plasma by comparing traditional centrifugal ultrafiltration with hollow fiber centrifugal ultrafiltration and application in pharmacokinetic study[J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1318: 265-269.
- [20] Jørgensen AR, Hansen J, Bue M, et al. Microdialysis as a sampling tool for the chemotherapeutic agent Doxorubicin[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2024, 239: 115872.
- [21] Zhuang L, Xia H, Gu Y, et al. Theory and application of microdialysis in pharmacokinetic studies[J]. *Curr Drug Metab*, 2015, 16(10): 919-931.
- [22] Buerger C, Joukhadar C, Muller M, et al. Development of a liquid chromatography method for the determination of linezolid and its application to in vitro and human microdialysis samples[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003, 796(1): 155-164.
- [23] Lilleøre JG, Vittrup S, Tøstesen SK, et al. Comparison of intravenous microdialysis and standard plasma sampling for monitoring of vancomycin and meropenem plasma concentrations-an experimental porcine study[J]. *Antibiotics*, 2023, 12(4): 791.
- [24] Roszkowska A, Miekus N, Baczek T. Application of solid-phase microextraction in current biomedical research[J]. *J Sep Sci*, 2019, 42(1): 285-302.
- [25] Ji X. Applications of headspace solid-phase microextraction in human biological matrix analysis[J]. *Rev in Anal Chem*, 2022, 41(1): 180-188.
- [26] Leszczyńska D, Hallmann A, Treder N, et al. Recent advances in the use of SPME for drug analysis in clinical, toxicological, and forensic medicine studies[J]. *Talanta*, 2024, 270: 125613.
- [27] Hansen F, Øiestad EL, Pedersen-Bjergaard S. Bioanalysis of pharmaceuticals using liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal* 2020, 189: 113446.
- [28] 白玉, 范玉凡, 葛广波, 等. 色谱技术在药物-血浆蛋白相互作用研究中的应用进展[J]. *色谱*, 2021, 39(10): 9.
- [29] Farcaš E, Pochet L, Crommen J, et al. Capillary electrophoresis in the context of drug discovery[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 144: 195-212.
- [30] Jia Z, Ramstad T, Zhong M. Determination of protein-drug binding constants by pressure-assisted capillary electrophoresis (PACE)/frontal analysis (FA)[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, 30(3): 405-413.
- [31] Wan H, Östlund Å, Jönsson S, et al. Single run measurements of drug-protein binding by high-performance frontal analysis capillary electrophoresis and mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19(12): 1603-1610.
- [32] Shibukawa A, Kuroda Y, Nakagawa T. High-performance frontal analysis for drug-protein binding study[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1999, 18(6): 1047-1055.
- [33] Fotouhi L, Banafsheh S, Heravi MM. Electrochemistry of the interaction of furazolidone and bovine serum albumin[J]. *Bioelectrochemistry*, 2009, 77(1): 26-30.
- [34] Johnson CM. Isothermal titration calorimetry[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2263: 135-159.
- [35] Yan Z, Ma L, Huang J, et al. New methodology for determining plasma protein binding kinetics using an enzyme reporter assay coupling with High-Resolution mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2023, 95(8): 4086-4094.