

谨以此文庆贺周同惠院士 80 华诞 !

## 酮洛芬与蛋白结合作用的高效液相色谱-迎头分析法研究及其与高效毛细管电泳-迎头分析法的比较

周大炜<sup>1,2</sup>, 李发美<sup>2</sup>

(1. 天津大学药学院, 天津 300072; 2. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要** :采用高效液相色谱-迎头分析法(HPLC-FA),以 67 mmol/L (pH 7.4,  $I = 0.17$  mol/L) 的等渗磷酸盐缓冲液为流动相, Pinkerton GFF II-S5-80 内表面反相柱(150 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm) 为固定相, 254 nm 下检测, 研究了酮洛芬与人血清白蛋白(HSA)的结合作用, 通过非线性回归参数估算求得酮洛芬与 HSA 的结合参数。与高效毛细管电泳-迎头分析法(HPCE-FA)相比, HPLC-FA 法具有高灵敏度的优势, 但进样量较大, 分析时间较长。HPLC-FA 法的测定结果表明, HSA 分子上酮洛芬的两类结合位点(第一类和第二类)共存。当酮洛芬与 HSA 的量比较低时, 酮洛芬主要结合在第一类位点; 当它们的量比较高时, 结合才发生在第二类结合位点。

**关键词** :高效毛细管电泳-迎头分析; 高效液相色谱-迎头分析; 人血清白蛋白; 蛋白结合作用; 酮洛芬  
中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2004)06-0601-04

## Study of Protein Binding in Ketoprofen Using Liquid Chromatography Frontal Analysis in Comparison with Capillary Electrophoresis Frontal Analysis

ZHOU Dawei<sup>1,2</sup>, LI Famei<sup>2</sup>

(1. College of Pharmaceuticals & Biotechnology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Pharmaceutical College, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**Abstract** : A method of high performance liquid chromatography-frontal analysis (HPLC-FA) was developed to study the binding of ketoprofen to human serum albumin (HSA) and it was compared with high performance capillary electrophoresis-frontal analysis (HPCE-FA). The separation was performed using Pinkerton GFF II-S5-80 internal-surface reversed-phase silica column (150 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm) at pH 7.4 in a 67 mmol/L isotonic sodium phosphate buffer at 37 °C. Other conditions included a flow rate of 0.2 mL/min, UV detection at a wavelength of 254 nm and an injection volume of 950 μL. A trapezoidal peak of the unbound ketoprofen appeared after HSA elution in the chromatogram. The plateau height of the peak was employed to determine the concentration of unbound ketoprofen in the HSA equilibrated sample solution. The HPLC-FA method provides the advantage of high sensitivity and however the disadvantages of large sample size and long analytical time when compared with HPCE-FA. HPLC-FA is applicable to the binding parameter estimation of ketoprofen to both primary and secondary sites, which are  $0.37 \times 10^6$  L/mol and 1.4 for  $K_1$  (the association constant) and  $n_1$  (the number for the binding sites per molecule HSA), respectively, and  $0.005 \times 10^6$  L/mol and 7.2 for  $K_2$  and  $n_2$ , respectively. In contrast, HPCE-FA measures parameters for only the secondary binding sites;  $K_2$  of  $0.018 \times 10^6$  L/mol and  $n_2$  of 2.54 can be estimated. It is found that ketoprofen binds mainly at the primary sites at a lower mole ratio of ketoprofen versus HSA, and the binding at the secondary sites occurs at a higher ratio.

**Key words** : high performance capillary electrophoresis-frontal analysis; high performance liquid chromatography-frontal analysis; human serum albumin; protein binding interaction; ketoprofen

收稿日期 2004-04-07

作者简介:周大炜,女,博士,研究方向为药物-蛋白结合作用的色谱方法, Tel (022)87401575, E-mail :dawei1204@yahoo.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(批准号 29975018).

高效液相色谱-迎头分析法(HPLC-FA)是基于凝胶过滤迎头分析法的原理<sup>[1]</sup>发展起来的色谱方法,适宜高亲和势的疏水性药物-血浆蛋白结合作用的分析,人血浆样品也可不经任何处理直接进样分析<sup>[2]</sup>,通过柱切换技术和手性色谱柱相连可进行蛋白结合作用的立体选择性研究<sup>[3,4]</sup>。以传统的超滤法作为参比,不同性质的药物如吲哚美辛、华法令、水杨酸盐、乙酰唑胺、卡马西平和头孢哌酮等<sup>[5-8]</sup>作模型药物进行的方法学确证表明,两种方法的结果吻合得很好。本文应用HPLC-FA法研究了非甾体抗炎药——酮洛芬与人血清白蛋白(HSA)的结合作用,并与高效毛细管电泳-迎头分析法(HPCE-FA)进行了比较。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

日本分光公司Jasco PU-980 HPLC仪,日本分光公司Jasco UV-975紫外检测器,CKChrom™色谱工作站(Scientific System Inc),1 mL定量环。

HPLC-FA条件:色谱柱为Pinkerton GFF II-S5-80内表面反相(ISRP)柱,150 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm (Regis Chemical Company, Illinois, USA);流动相为67 mmol/L磷酸盐等渗缓冲液(pH 7.4,离子强度*I*为0.17 mol/L)(简称P液);流速0.2 mL/min;检测波长254 nm;进样量950 μL;柱温37 ℃。

高效毛细管电泳仪:VUV-22紫外检测器,HV-301 HVPS毛细管高压电源(优尼特通微技术有限公司,中国内蒙古通辽);未涂层熔融石英毛细管柱,65 cm × 75 μm i. d.,有效长度35 cm(河北永年光导纤维厂);江申色谱工作站(大连江申分离科学技术公司)。

酮洛芬由中国生物药品检验所提供,HSA(脱脂脂肪酸的球蛋白,Sigma No. 3782)购于Sigma公司(St. Louis, MO, USA)。HSA溶液(80 μmol/L)由P液溶解配制。实验用水为二次蒸馏去离子水。其他化学试剂均为分析纯试剂(市售)。

### 1.2 流动相的配制

将10份67 mmol/L磷酸氢二钠(含氯化钠5 g/L)和1份67 mmol/L磷酸二氢钠(含氯化钠4 g/L)充分混合,0.45 μm微孔滤膜过滤并以10 000 r/min速率高速离心脱气5 min,即得。

### 1.3 酮洛芬样品溶液的配制

精密称取酮洛芬对照品15.6 mg于小烧杯中,用适量P液超声溶解,小心转移至25 mL容量瓶中,用P液定容,得2 mmol/L对照品储备液。精密

移取一系列不同体积的对照品储备液,用适量P液稀释至待测浓度的2倍,涡旋混合1 min后精密加入等体积的HSA溶液,摇匀,室温放置1 h以上直至分析。

### 1.4 HPLC-FA测定方法

取950 μL上述已达平衡的样品混合液,不经任何处理通过进样环加到ISRP柱上。在HSA的“大平头”峰后,酮洛芬以含平坦区域的带状峰形式洗脱出来。平坦区域的高度代表样品混合液中游离药物酮洛芬的浓度。将此高度与不含HSA的酮洛芬标准溶液的高度进行比较,求出游离药物的浓度。

### 1.5 HPCE-FA测定方法

将毛细管充满运行缓冲溶液,柱温为室温,已达结合平衡的样品溶液虹吸进样,进出口液面高度差为11 cm,进样时间为80 s,然后将毛细管进样端立即浸入缓冲溶液中,工作电压10 kV,测定波长214 nm,灵敏度*S* = 0.002。结果发现在蛋白(或蛋白-药物复合物)平台的后面产生游离药物的平台。将此平台的高度与不含HSA的药物标准溶液的高度进行比较,求出游离药物的浓度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 精密度

取“1.3”节中已达平衡、含50 μmol/L酮洛芬和40 μmol/L HSA的样品溶液,分别按“1.4”和“1.5”节所述方法重复进样6次,所测峰高值的相对标准偏差(RSD)分别为2.9%和2.7%。

### 2.2 重复性

按“1.3”节所述分别平行制备6份含50 μmol/L酮洛芬和40 μmol/L HSA的样品溶液,分别按“1.4”和“1.5”节所述方法测定游离药物的浓度,所测峰高值的RSD分别为2.8%和3.1%。

### 2.3 稳定性

取“1.3”节中已达平衡、含50 μmol/L的酮洛芬和40 μmol/L HSA的样品溶液,在0,12,24,48 h时分别按“1.4”和“1.5”节所述方法进样,测定峰高,所测峰高值的RSD分别为3.4%和3.2%(*n* = 5)。结果表明在48 h内样品溶液稳定。

### 2.4 进样量的确定

由于高效迎头分析法中平台区域的出现非常必要,因此进样量必须足够大以产生平台区域。本实验选择的进样体积是950 μL。

### 2.5 游离药物浓度的测定

酮洛芬-HSA的HPLC-FA色谱图见图1-a。图1-a中游离酮洛芬与HSA实现了很好的分离,游离药物形成的梯形色谱峰的平台区域平坦。游离药物

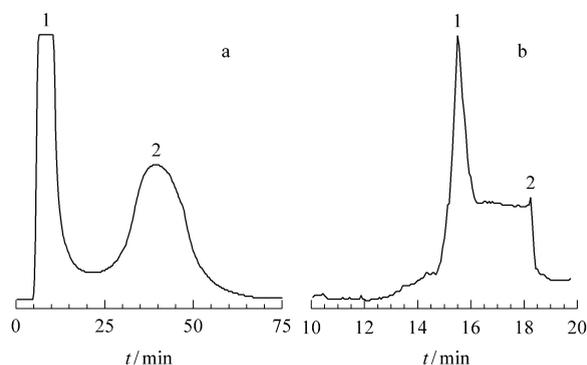


图1 酮洛芬与40  $\mu\text{mol/L}$  人血清白蛋白平衡混合液的高效液相色谱-迎头分析色谱图(a)和毛细管电泳-迎头分析电泳图(b)的比较

Fig.1 Comparison of chromatogram of ketoprofen equilibrated with 40  $\mu\text{mol/L}$  HSA solution obtained by HPLC-FA method (a) with its electropherogram obtained by HPCE-FA method (b)

a. 75  $\mu\text{mol/L}$  ketoprofen; b. 125  $\mu\text{mol/L}$  ketoprofen.

Experimental conditions: a. Pinkerton GFF II-S5-80 internal-surface reversed-phase silica column (150 mm  $\times$  4.6 mm i. d.); mobile phase, phosphate buffer (pH 7.4,  $I = 0.17$  mol/L); flow rate, 0.2 mL/min; temperature, 37  $^{\circ}\text{C}$ ; injection volume, 950  $\mu\text{L}$ ; UV detection at 254 nm. b. 67 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4); capillary length 65 cm (35 cm to the detector); detection at 254 nm; 10 kV, 80 s hydrostatic injection (11 cm high). 1. HSA; 2. ketoprofen.

表1 酮洛芬-人血清白蛋白的结合参数

Table 1 The binding parameters of ketoprofen to HSA

HSA/ ( $\mu\text{mol/L}$ )	Total concentration range of ketoprofen/( $\mu\text{mol/L}$ )	Method	$T/^{\circ}\text{C}$	Parameters				Reference
				$K_1/(10^6\text{L/mol})$	$n_1$	$K_2/(10^6\text{L/mol})$	$n_2$	
40	10 - 150	HPLC-FA	25	0.37	1.4	0.005	7.2	this work
40	62 - 125	HPCE-FA	25			0.018	2.54	this work
50	4.6 - 122	Microdialysis-HPLC	37	3.18	0.799	0.201	2.15	[9]
550	100 - 300	HPFA	25	2.33	1.12			[10]
550	100 - 300	Ultrafiltration-HPLC	25	2.37	1.13			[10]
		Continuous ultra-filtration		1.37				[11]

$n_1, n_2$ : the number for both primary and secondary binding sites per molecule HSA;  $K_1, K_2$ : the corresponding association constant.

## 2.7 HPLC-FA 法与 HPCE-FA 法的比较

HPLC-FA 法与 HPCE-FA 法都可用于药物-蛋白结合作用研究。为了更好地理解和应用这两种方法,制备了系列不同浓度酮洛芬-40  $\mu\text{mol/L}$  HSA 混合溶液,并分别应用两种方法进行了分离分析。

### 2.7.1 分析时间

将酮洛芬的同一个样品溶液的 HPCE-FA 电泳图和 HPLC-FA 色谱图(图1)比较,可知 HPCE-FA 法每次进样的分析时间不足 25 min,而 HPLC-FA 法要超过 50 min。

### 2.7.2 检测限

由 HPLC-FA 和 HPCE-FA 法分离分析系列不同浓度酮洛芬-40  $\mu\text{mol/L}$  HSA 的平衡溶液得到的 Scatchard 等温线见图2。很显然,前者可得到结合

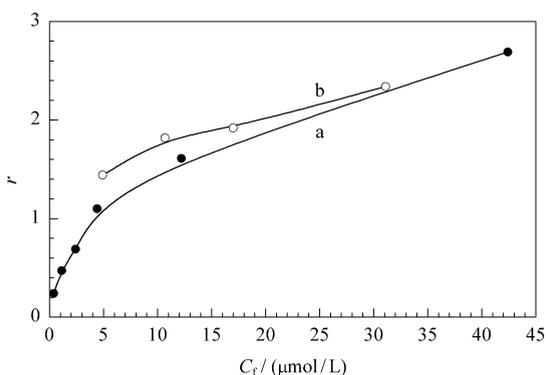


图2 高效液相色谱-迎头分析法(a)和毛细管电泳-迎头分析法(b)得到的酮洛芬-人血清白蛋白结合曲线的比较

Fig.2 Comparison of binding curve for ketoprofen-HSA obtained by HPLC-FA method (a) with that obtained by HPCE-FA method (b)

For experimental conditions, see Fig.1.

曲线的全貌,后者由于检测器的短光程严重限制了它的灵敏度,仅得到了部分结合曲线,在低浓度范围则无法检测。对酮洛芬而言,HPLC-FA法的检测限为 $0.1 \mu\text{mol/L}$ ,而HPCE-FA法为 $2 \mu\text{mol/L}$ 。显然,后者不适于临床样品的分离分析。

### 2.7.3 进样量

HPLC-FA法所需进样量受所研究体系结合作用的强弱限制,随着待测药物游离部分的增加,需增大进样量以形成梯形峰。但若采用HPCE-FA法,只要所研究的体系其动力学快速可逆,则进样量对任何样品而言没有区别,仅需不足 $100 \text{ nL}$ 的进样量,比HPLC-FA法的小很多。因此,HPCE-FA法非常适于分析珍稀样品中对检测器高度灵敏的药物的蛋白结合作用。

### 2.7.4 其他

HPLC-FA法与按分子大小顺序分离样品各组分的液相色谱方法(也称凝胶色谱法)相似,它的分离过程并不完全依赖于溶质与流动相和固定相的结合作用,缺点主要是进样量大,分析时间长,只有纯化过的蛋白质样品才可使用,特别是色谱峰容量较小,不能分离极性较强或疏水性相近的药物。流动相是不含有机溶媒的生理等渗缓冲溶液,适宜高亲和势疏水性较强的药物-HSA结合作用系统的分析,分离时间与被分析药物的疏水性成正比。

HPCE-FA法中游离药物与蛋白及药物-蛋白的复合物的分离依赖于它们各自的有效电泳淌度,其分离效率远高于HPLC-FA法。原因在于前者属于电力驱动分离系统<sup>[12]</sup>,在毛细管中流体的流型呈扁平的柱塞形状向前流动,这种流型有利于防止扩散,提高分离效率;而后者属于压力驱动分离系统,其流型呈抛物线形状向前流动,这种流型易造成扩散。

在药物-蛋白结合作用研究方面,HPCE-FA法与HPLC-FA法相比具有下列优点<sup>[13]</sup>:(1)快速;(2)优化及运行缓冲液的更换操作简单;(3)特别适宜极性化合物的分离;(4)批操作成本低,特别是仅需纳升级的进样量,但灵敏度较差,应用紫外法检测一般仅能得到部分结合曲线。随着HPCE技术的飞速进步,应用HPCE进行血清中药物立体选择性分离分析的结果与HPLC法的重现性和精密度无统

计学差异<sup>[14]</sup>,并发现应用膜预浓缩毛细管电泳-质谱技术(mPC-CE-MS)在不丧失分离度或分离效率的前提下可克服HPCE法较差的浓度检测限。

特别地,HPCE分离在(1)被分析物的来源受到极大限制<sup>[15]</sup>(2)无法得到纯化过的被分析物或被分析物的结合特征未知(3)其他的结合分析方法由于复合物的形成引起严重不佳的分离度变化;(4)可预测由于复合物的形成引起电泳淌度变化;(5)众多候选药物做结合活性筛选等情况下可以得到保证。

总而言之,在药物-蛋白结合作用的研究方面应有效、合理地应用两种技术,两者是互为补充而非竞争的关系。

### 参考文献:

- [1] Wood G C, Cooper P F. *Chromatogr Rev*, 1970, 12: 88
- [2] Shibukawa A, Terakita A, He J Y, Nakagawa T. *J Pharm Sci*, 1992, 80: 710
- [3] Shibukawa A, Ishizawa N, Kimura T, Sakamoto Y, Ogita K, Matsuo Y, Kuroda Y, Matayatsu C, Nakagawa T, Wainer I W. *J Chromatogr B*, 2002, 768: 177
- [4] Shibukawa A, Yoshikawa Y, Kimura T, Kuroda Y, Nakagawa T, Wainer I W. *J Chromatogr B*, 2002, 768: 189
- [5] Shibukawa A, Nakagawa T, Nishimura N, Miyake M, Tanaka H. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37: 702
- [6] Qiao Mingxi, Guo Xingjie, Li Famei. *Chinese Journal of Chromatography* (乔明曦, 郭兴杰, 李发美. 色谱), 2001, 19(4): 329
- [7] Qiao M X, Guo X J, Li F M. *J Chromatogr A*, 2002, 952: 131
- [8] Li F M, Qiao M X, Guo X J. *Biomed Chromatogr*, 2003, 17(1): 53
- [9] Wang Hailin, Zou Hanfa, Zhang Yukui. *Science in China (Series B)* (汪海林, 邹汉法, 张玉奎. 中国科学(B辑)), 1998, 28(1): 71
- [10] Shibukawa A, Terakita A, He J Y, Nakagawa T. *J Pharm Sci*, 1992, 81: 710
- [11] Rehse K, Fiedler B. *Arch Pharm*, 1989, 322: 241
- [12] Deng Yanzhuo, He Jinlan. *High-Performance Capillary Electrophoresis*. Beijing: Science Press (邓延倬, 何金兰. 高效毛细管电泳. 北京: 科学出版社), 2000. 1
- [13] Shihabi Z K. *J Chromatogr A*, 1998, 807: 27
- [14] Clohs L, McErlane K M. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 31(3): 407
- [15] Heegaad N H H, Nissen M H, Chen D D Y. *Electrophoresis*, 2002, 23: 815