

体液中 DTC 含量的测定方法及其药代动力学研究

安徽祁门县532医院(安徽 245600)

邓嵩峰

马鞍山市药材公司(马鞍山 243000)

韦文俊 王勇

二乙基二硫代氨基甲酸钠(sodium diethyldithiocarbamate, DTC)是一种免疫调节剂^[1],能特异性激活T细胞和NK细胞^[2],而不直接影响B细胞和巨噬细胞, DTC能杀死瘤细胞,寄生虫,真菌及细菌^[3],有抗细菌及抗真菌作用。其免疫作用可能与诱导肝脏产生专特作用于T细胞的激素样物质有关^[4]。对于改善各种免疫功能低下状态,对肿瘤手术,放疗或化疗引起的免疫抑制,某些慢性感染和自身免疫性疾病均有一定疗效。临床上已作为艾滋病治疗药物^[5];接受顺铂化疗时, DTC作为肾保护剂使用;用于治疗口腔扁平苔癣^[6];治疗慢性支气管感染及肺癌^[7]。DTC被越来越广泛地应用于临床,但国内外尚未见对其吸收,分布及代谢情况的系统研究的报道。主要是因为DTC化学性质不稳定,分解代谢迅速^[8],给药后,体内药物水平很快降到很低。于是对其分析测定方法要求较高。不仅要灵敏,专一,而且要操作简便,分析速度快。DTC作为Disulfiram(DSF)的重要代谢产物,上述测定方法的局限性也使DSF临床使用了40多年^[9],仍缺乏全面系统的药代动力学资料。因此建立一种快速简便,专一而又灵敏的DTC测定方法对DTC及DSF的药代动力学研究具有深刻意义。文献报道DTC含量的分析测定方法主要有分光光度法,放射性同位素法,气相色谱法及高效液相色谱法。本文就上述四种DTC测定方法及DTC药代动力学作一综述。

一、体液中DTC测定方法

1. 分光光度法

八十年代以前,分光光度法是最为广泛的DTC及其类似物的分析测定方法^[11-13]。测定原理为DTC与铜等金属离子形成有色物质,用有机溶剂萃取,于430 nm处测OD值定量。但此法专一性较差,常受DSF,二甲基二硫代氨基甲酸钠及二硫化四甲秋兰姆等结构类似物的影响^[14];又因血浆蛋白的影响,测定血中DTC时准确性较差^[15]。同时,形成的有色物质在氯仿等提取液中不够稳定^[8],影响了测定的准确性。近年仍有关于分光光度法测定DTC的报道^[16],灵敏度有所提高可达6.0 μg,但总体来说,此法灵敏度低,往往不适于临床研究,多限于反应混合液中DTC的测定。

2. 放射性同位素法

同位素分析就是将具有放射性的同位素掺入化合物结构中,利用同位素的放射性计数进行定量的一种分析手段,具有较高的灵敏度,且干扰因素较少。用同位素技术测定DTC及其代谢物含量的方法是由Stromme^[14]首先建立的,用Sephadex柱及硅胶过滤技术分离DTC及其代谢物耗时太多。Faiman^[17]等人应用萃取或沉淀来分离DTC及其代谢物,藉此建立的同位素法较为简便。血样或组织匀浆的离心上清,加戊烷萃取DTC-Me; DTC加MeI甲基化后再萃取;保留在水相中的蛋白结合S³⁵用三氯醋酸沉淀;葡萄糖醛酸结合的DTC加Na₂SO₄/HCl及氯

化钡沉淀；无机硫则一直保留在水相中。之后对分离组分分别进行放射性记数。Faiman^[18]及Guillaumin^[2]等人用此法研究了小鼠静注 S^{35} DSF及 S^{35} DTC后组织分布情况。但此法在一定程度上受到放射性同位素掺入技术及放射性污染的限制，操作不便，又由于DTC体内分解代谢迅速，放射性同位素法跟踪的是放射性硫原子。其测定结果往往不能准确反映DTC本身及其代谢产物DTC-Me的体内过程。故本法多应用于DTC体内组织分布的半定量研究，不适于血浆DTC及其代谢产物DTC-Me的药代动力学研究

3. 气相色谱法

气相色谱法因其灵敏专一而被广泛应用。Wells和Koves^[19]率先利用气相色谱法测定服用DSF后呼出气体中 CS_2 含量，借以粗略地了解DSF的代谢情况。Sauter和Wartburg^[20]则借助顶部空间技术(headspace technique)通过测定 CS_2 而定量DTC或DSF。他们在60ml的玻璃瓶中加入0.4g氯化钠，在氮流下用橡皮塞外加铝帽封口，用注射器依次将样品，10mg半胱氨酸盐酸，0.5ml 98%以上的甲酸加入瓶中。继尔测定瓶上部空间中 CS_2 量，间接定量DSF及DTC。但此法无法分辨DSF，DTC或DTC-Me产生的 CS_2

Cobby^[8]等对上述GC法进行改进，用S-甲基化使DTC生成DTC-Me，用含内标联苯的 CCl_4 液提取，氮气吹干浓缩，进行测定，最低检测限极达0.2ug/ml。此法被用以研究狗静滴DTC后体内分布代谢情况^[21]及体外狗血和人血中DTC的稳定性^[9]。由于DTC及DTC-Me挥发性较差，对热敏感。高温操作的气相色谱法直接测定有一定困难。而通过测定 CS_2 来间接定量的方法，又存在专一性差，回收率低的不足。

气相色谱法与质谱联用提高了分析灵敏度，改善了专一性。可用于药代动力学研

究^[5, 22] 血样用氘代碘甲烷衍生化，可用一份样品同时测定DTC与DTC-Me^[5]，最低检测限可达3ng/ml，但因仪器昂贵，普通实验室难以开展。

4. 高效液相色谱法

高效液相色谱(HPLC)法是体内药物分析中应用最为广泛的方法，具有准确，灵敏及专一的特点，已成为国内外开展药代动力学研究的主要手段。建立灵敏快速的正相^[23, 24]，及反相^[25, 26]高效液相色谱法，测定体液中DTC及其代谢物DTC-Me的浓度，使DTC的药代动力学研究成为可能。

水溶性DTC甲基化生成DTC-Me^[23, 24, 26]，有机溶剂(如氯仿)提取，氮气吹干，乙腈溶解，浓缩后进行测定。改用碘乙烷乙基化^[25]，可同时测定DTC与DTC-Me，缩短了分析时间。Lieder^[27]等用 $Et_3O^+ \cdot BF_4^-$ 作为乙基化试剂，虽提高了乙基化速度与效率，但Meerwein试剂不稳定难以保存。乙基化效率和方法回收率与试剂保存期长短有密切联系。

鉴于紫外检测专一性不强，常受有紫外吸收的非极性物质的干扰。对DSF及DTC进行络合^[28]。于高波长检测可提高方法专一性。Irth^[30]等曾用铜反应器进行柱后络合反应测定二硫化四甲秋兰姆及DSF，此后他们又利用络合反应，结合HPLC法及分光光度法测定尿中DSF及其代谢物DTC， $Cu(DTC)_2$ ^[28]。尿中加入 Pb^{2+} 与DTC络合生成 $Pb(DTC)_2$ ，后者与 $Cu(DTC)_2$ 及DSF经预柱纯化浓缩，分析柱分离后， $Pb(DTC)_2$ 在柱后磷酸铜反应器中与 Cu^{2+} 进行离子交换生成 $Cu(DTC)_2$ ， $Cu(DTC)_2$ 不经络合，435nm处检测 $Cu(DTC)_2$ 定量。整个过程只需15min，但金属铜及磷酸铜反应器寿命分别只有几天和几周，而且此法不能检测DTC的重要代谢物DTC-Me。

虽然，HPLC法分析速度较快，但进样前需要提取纯化及浓缩等预处理，耗时耗

力,是研究人员长期困扰的问题。改良传统的HPLC法,简化预处理,甚至血浆直接进样测定已成为迫切需要。

除上述提到的四种测定方法之外,还有极谱法^[31]及碘量法^[32]。但这两种方法灵敏度低,仅适于体外含量测定。

二、DTC药代动力学

已见报道关于DTC及DTC-Me的分析测定方法都没有真正达到快速简便、灵敏的要求。这就限制了药代动力学的全面开展。既往关于DTC药代动力学的报道较少,而且结果相差很大。

大鼠iv DSF 33 mg/kg,血浆DTC-Me水平较低,仅 30 ± 6 ng/ml但变化较小,DTC浓度由初始650 ng/ml降至7 h的20 ng/ml左右,消除半衰期为 1.5 h^[26],直接给大鼠iv DTC 200 mg/kg,通过检测CS₂定量。却发现DTC、DTC-Me消除半衰期分别只有1.34, 20.4 min^[33]。不过,其实验设计不尽合理,取样点仅5个。大鼠ip DTC 96.2 mg/kg,测得DTC、DTC-Me的半衰期分别为7.97, 76.2 min^[4]。文献报道^[5],人口服DTC肠溶胶囊10 mg/kg后,GC-MS法可于2.5 h在血中检测到DTC及DTC-Me,达峰时间分别为3, 3.5 h,峰浓度为210, 550 ng/ml。Cobby^[21]等给狗按5.5, 2.75 mg/min的速度先后各静滴DTC 50 min。GC法考察了总“DTC”浓度的经时变化。还研究了狗静滴等摩尔DTC-Me后,DTC-Me血液经时变化,按配置模型处理所得实验数据。求得DTC及DTC-Me的消除半衰期分别为3.38, 49.2 min。表观机体清除率分别为0.0331, 0.0319 l/kg。分布容积分别为0.161, 2.16 l/kg。但Lieder^[27]等发现Beagle狗iv DTC 25 mg/kg后,消除半衰期仅7 min,是Cobby等结果的2倍。我们利用其药时曲线判断,DTC在狗体内配置模型符合一室模型。Faiman^[23]考察了15例酗酒者口服DSF 250 mg药代动力学。结果表

明,DTC及DTC-Me在8-10 h达峰,消除半衰期分别为15.5和22.1 h。以CS₂经肺及以DTC-葡萄糖醛酸结合物(DTC-glu)经尿消除药量分别占剂量的22.4%、1.7%。Kaslander^[34]曾报道人服用DSF后,仅0.75% DSF以DTC-glu经尿排泄。在Stromme的研究中^[35],经肺消除的药量却占剂量的50%。而狗iv³⁵S DSF后,尿中出现³⁵S DTC-glu,无机硫,³⁵S DSF,³⁵S DTC-Me,其中³⁵S DTC-glu占绝大部分,但尿排泄量不超过剂量1%^[18]。DTC在体内分布迅速。Guillaumin^[2]等给小鼠iv³⁵S DTC 200 mg/kg后5 min发现,除肺及大脑白质外,所有被考察组织中都能检测到³⁵S。其中肝及胸腺是主要吸收部位。在45 min观察期内一直保持高水平的放射性。大脑皮层中³⁵S主要来自³⁵S DTC-Me,虽然水平不高,但随时间变化较小。肾,脾中³⁵S的动力学类似于血浆,半衰期只有15 min。提示这些组织器官分布少,可能是DTC途径器官。

研究报告结果相差较大,可能与实验设计及测定方法灵敏度低有关。要获得全面的药代动力学资料,必须先建立一种灵敏度高,操作简便快速的DTC分析测定方法。此方面的研究有待进一步深入。

参考文献

- [1] Renoux G. Dev Immunol, 1982, 17 (Curr Concepts Hum Immunol Cancer Immunomodulation): 575
- [2] Guillaumin JM, et al. Int J Immunopharmac, 1986, 8(8): 859
- [3] Renoux G. J Pharmac Paris, 1982, 13: 95
- [4] Renoux G. In: Fenichel RL, Chirigos MA, editors. Immune modulation agents and their mechanisms. New York: Marcel Dekker, 1984: 607
- [5] Scappaticci B, et al. J Chromatogr, 1990; 534: 57
- [6] Su M, et al. Acta Pharmacol Sci, 1991, 12(4): 378

- [7] 徐炳祥等,军队医药工业,1993,3(3):20
- [8] Cobby J, et al. J Pharmacol Exp Ther, 1977,202(3):724
- [9] Eneanya DI, et al. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 1981,21: 575
- [10] Sauter AM, et al. Arzneim-Forsch(Drug Res), 1976,26:173
- [11] Tompsett SL, Acta Pharmacol et Toxicol, 1964,21:20
- [12] Rangaswamy JR, et al. J Assoc Off Agric Chem, 1971,54(2):1120
- [13] Fischer W. Anal Chem, 1952:90:137
- [14] Stromme JH. Biochem Pharmacol, 1965, 14:393.
- [15] Stromme JH. Biochem Pharmacol, 1965: 14:381
- [16] Malik AK. et al. Talanta, 1990, 37(12): 1205
- [17] Faiman MD. et al. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1977,17(3):481
- [18] Faiman MD, et al. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1978, 21(3): 543
- [19] Wells J. et al. J Chromatogr, 1974, 92: 442
- [20] Sauter AM. et al. J Chromatogr, 1977, 133:167
- [21] Cobby J. et al. J Pharmacokinet Biopharm, 1978,6(5): 369
- [22] Deruaz D. et al. Anal Letts, 1991,24(9): 1531
- [23] Faiman MD. et al. Clin Pharmacol Ther, 1934,36(4):520.
- [24] Jensen JC. et al. J Chromatogr, 1980: 181: 407
- [25] Masso PD. et al. J Chromatogr, 1981: 224:457.
- [26] Giles HG. et al. J Liq Chromatogr, 1982, 5(5):945
- [27] Lieder PH. et al. Anal Letts. 1985, 18 (B1):57
- [28] Irth H. et al. J Chromatogr, 1988, 424: 95
- [29] Irth H. et al. Anal Chem, 1986, 59:93
- [30] Irth H. et al. J Chromatogr, 1988, 370: 439.
- [31] Roth W. et al. J Chromatogr, 1991, 222: 13
- [32] Zbigniew K. et al. Chem Anal, 1980, 25 (3): 465
- [33] Prickett CS. et al. Biochim Biophys Acta, 1953, 12:542
- [34] Kaslander J. Biochim Biophys Acta, 1963,71:730
- [35] Stromme JH, et al. Biochim Biophys, 1966, 15: 287

人工肾透析液中醋酸钠含量测定

上海华东医院(上海 200040) 郑慧丽

人工肾透析液(含冰醋酸、醋酸钠的灭菌水溶液)系我院自行研制的供体外透析用制剂,临床主要用于治疗急性肾功能衰竭和慢性肾功能不全等,取得较好疗效。其中醋酸钠的含量测定有非水滴定法^[1],离子交换树脂法,操作均繁琐,^[2]用酸直接滴定又有困难^[3],本文采用混合指示剂及混合溶剂后采用酸碱滴定,方法简便快速,结果满意。

一、试剂

0.1 mol/L HCl, 0.1 mol/L NaOH标准

液,95%乙醇(AR级),甘油(药用规格),酚酞指示剂,0.2%亚甲基蓝水溶液—0.1%二甲黄醇液指示剂(1:2)

二、方法与结果

冰醋酸的测定:取本品2 ml加酚酞指示剂1滴,用0.1 mol/L NaOH标准液滴定。每毫升0.1 mol/L NaOH相当于0.006005g冰醋酸。

醋酸钠的测定:取乙醇:甘油(1:1)的混合液5 ml,加亚甲基蓝—二甲基指示剂5滴左右,