

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

高膽紅素血症對藥物蛋白結合的影響—以青黴素及頭芽孢菌素為例

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNPB-93-08

執行期間：93年1月1日至93年12月31日

計畫主持人：楊竹茂 副教授

共同主持人：

計畫參與人員：蔡珍瑋 副教授

執行單位：藥學系

中華民國 94 年 2 月 27 日

中文摘要

本計劃旨在探討黃疸症病人在使用藥物時，是否因血清中膽紅素濃度的升高而對藥物與蛋白質之結合率產生變化而可能影響藥物動力學之改變。

本研究首先收集 85 個總膽紅素 > 2.0 mg/dl 之血清樣品，經測定其總膽紅素、直接型膽紅素濃度與白蛋白濃度外，再以 HBABA [2-(4'-hydroxybenzene azo) benzoic acid] 溶液與血清反應，於波長 510 nm 下測定吸光度，與標準白蛋白溶液(4 g/dl)依同法所測得之吸光度比較，以測得血清所留存的蛋白結合能力。

藥物與血清蛋白結合之實驗則分別以青黴素類抗生素 Piperacillin 與頭芽孢菌素類抗生素 Cefoperazone 為模型藥物，與定量不同濃度(1~30 mg/dl)之膽紅素血清蛋白於 37°C 下孵育平衡後，經由一種錐形超過濾膜(ultrafiltration membrane cone)於高速離心機離心過濾，以 HPLC 測定過濾液中抗生素之濃度，再計算其被血清蛋白結合之百分比。

結果顯示血清中總膽紅素濃度與其存留的蛋白結合能力呈現顯著的負相關，其中，白蛋白濃度高於正常值 4.0 g/dl 之血清樣品(n=47)其相關係數為 -0.6119 (< 0.01)，而白蛋白濃度低於正常值 4.0 g/dl 之血清樣品(n=38)其相關係數為 -0.3835 (< 0.05)。

至於 piperacillin 及 cefoperazone 之蛋白結合率皆受到血清膽紅素的影響，呈現濃度依存性的降低。在血清膽紅素濃度為 20 mg/dl (0.342 mM) 時，前者之蛋白結合率從 21.34 % 降低至 6.57 %，而後者之蛋白結合率則自 90.18 % 降低至 64.16 %。顯示蛋白結合率越高的藥物，其受到血清膽紅素的影響越大。

由以上研究結果得知，血清膽紅素的增加確實能影響藥物之蛋白結合率，其原因為膽紅素能與藥物競爭血清蛋白結合位置，因而減少血清蛋白與藥物之結合能力。由於藥物之蛋白結合率對藥物之體內動態影響頗大，蛋白結合率之減低將使藥物自由態分子增加而可能導致藥物之作用增強、毒性增加，也可能改變排除速率常數，而使半衰期等諸多藥物動力學參數發生變化。因此黃疸病患在使用藥物時，需要考量血清膽紅素濃度對藥物體內動態的影響，特別是正常狀態下具有較高蛋白結合率之藥物，必要時可能需要改變劑量或投藥時程，甚至需要改變處方藥物。

關鍵字：高膽紅素血症、血清蛋白結合能力、抗生素

計畫緣由與目的

一般相信，蛋白質結合作用(protein binding)會影響藥物之生物活性，特別是抗菌劑如抗生素、磺胺藥等，進而影響其體內分佈及代謝與排除等動力學狀

態。血清中膽紅素過高(hyperbilirubinemia)的情形常發生在黃疸(jaundice)病人，如溶血性貧血、膽石症、膽道阻塞、肝硬化及急性肝炎等疾患。膽紅素易與血清白蛋白(serum albumin)結合，因此可能與藥物對白蛋白結合位置產生競爭，因而降低藥物之蛋白結合率，因此也可能改變藥物在體內之動態，引起血中藥物自由態濃度的改變而影響其藥效或引起不良作用。

由於黃疸病人常需要使用抗生素治療膽道或手術傷口之感染，爲了闡明血清膽紅素濃度對常使用之抗生素的影響，本研究分別使用兩種蛋白結合率差異懸殊之抗生素，piperacillin (蛋白結合率約為 20 %)及 cefoperazone (蛋白結合率約為 90 %)為模型藥物，以體外實驗方法測定此兩種抗生素在不同濃度的膽紅素存在下之蛋白結合率變化，作為爾後進行體內實驗的基礎。

材料與方法

I. 試藥及其他耗材

黃疸病人血清之收集：自國泰檢驗院之檢驗標本收集血清總膽紅素值異常(> 1.0 mg/dl)之血清，置於-20°C冰庫貯存至實驗前始解凍。

Piperacillin：購自台灣氰胺公司，Lot No.：3895-T003。

Cefoperazone：購自輝瑞藥廠，Lot No.：1132。

Crystalline human albumin：購自美國 Sigma 公司。

Bilirubin：購自美國 Sigma 公司。

HBABA [2-(4'-hydroxybenzene azo) benzoic acid]：購自美國 Sigma 公司。

Centriflo, ultrafiltration membrane cones：購自美國 Amicon, Corp. Lexington, Mass., D2137, USA.

其他試藥皆為西德默克公司產品

II. 儀器

高效液相層析儀：日本島津 LC-10AD，配備自動注射器。

分析管柱：Lichrosorb RP-18 (10 μm) 250 mm x 4 mm

偵測器：UV-VIS absorbance detector

冷卻式高速離心機：Ivan Sorvall super speed RC 2-B

III. 實驗方法

一、黃疸病人血清白蛋白存留藥物結合能量的測定

(一) 試劑溶液的配製：

1. 0.01 N 氫氧化鈉溶液：秤取 400 mg 以水溶解並稀釋至 1000 ml

2. 1 M Tris 緩衝液：秤取 Tris (hydroxymethyl) amino methane 121.4 g 以水

溶解，並稀釋至 1000 ml.

3. 色素儲備溶液:精確秤取 120 mg HBABA 於 500ml 容量瓶中,以 0.01 N 氫氧化鈉溶液溶解,並稀釋至刻度,此溶液應於 4。C 避光貯藏。

4. 操作用色素溶液(0.0003M):精確量取 150 ml 貯存色素溶液於 500 ml 燒杯中,加 300ml 水及 10 ml 1M Tris 緩衝液,加水至約 450ml,以鹽酸溶液調整 pH 值至 7.4 後倒入 500ml 容量瓶中,並以水稀釋至刻度。

5. 稀釋用緩衝液:量取 10 ml 1M Tris 緩衝液,加水約 450ml,以鹽酸溶液調整 pH 值至 7.4 後以水稀釋至 500ml.

6. 白蛋白儲備溶液: 秤取結晶人體白蛋白 7 g 於 100 ml 燒杯中,加 50 ml 0.9 %生理食鹽水溶解(必要時以玻璃棒輕輕攪動),待完全溶解後,移入 100 ml 容量瓶中,再以 0.9 %生理食鹽水稀釋至刻度,於 4。C 貯藏。

7. 白蛋白標準溶液: 各取適量白蛋白貯存溶液,以 0.9 %生理食鹽稀釋為 1, 2, 3, 4, 5 (g/dl)等一系列濃度的標準溶液。

(二)、血清的來源: 本實驗所有的血清取自新營市國泰檢驗院。採樣後同時以 SMA II 自動分析儀測定血清中白蛋白及膽紅素之濃度。

(三)、操作步驟: 每一樣品的測定各使用三隻 4ml 試管,依表(一)程序操作:

表(一) 配製血清一染料結合溶液的程序

No. of Tube	1	2	3
	Test	Dye Blank	Serum Blank
Serum (ml)	0.1	-	0.1
HBABA working Solution (ml)	3.0	3.0	-
Distilled water (ml)	-	0.1	-
Diluting buffer (ml)	-	-	3.0

以上各試管以振盪混合器充分混合後,以水為空白溶液,在五分鐘內於波長 510 nm 測定各試管液的吸光度。

(四)、計算方法:

$$\Delta A_T = A_T - A_{Dye} - A_{Ser} \quad \Delta A_T = \text{淨吸光度(Net Absorbance)}$$

A_T : 受試液(第一管液)之吸光度。

A_{Dye} : 色素空白液(第二管液)之吸光度。

A_{ser} : 血清空白液(第三管液)之吸光度。

血清白蛋白存留藥物結合能量百分比: 以存留 4 g/dl 標準白蛋白溶液之百分比表示:

$$\text{Reserve Binding Capacity (\%)} = \Delta A_T / \Delta A_s \times 100 \%$$

ΔA_s : 標準白蛋白溶液(4 g/dl)依同法操作所得之淨吸光度。

二、兩種抗生素蛋白質結合常教的測定:

(一)、試劑、溶液的配製

1. 1/15 M Sorensen 緩衝液(pH=7.4)

- (1) 精確稱取磷酸二氫鉀(KH_2P_4) 9.08 g 於 1000ml 容量瓶中以水溶解並稀釋至刻度。
- (2) 精確稱取無水磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4) 9.47 g 於 1000ml 容量瓶中以水溶解並稀釋至刻度。
- (3) 精確量取(1)溶液 196ml 與(2)溶液 804ml，混合均勻，以 0.1N 氫氧化鈉溶液或鹽酸溶液調整 pH 值至 7.4。

2. 人體白蛋白溶液: 依一、(一)之 6· 同法配製。

3. 各種抗生素儲備溶液的配製: 精確稱取適量的各抗生素分別以水稀釋至一定濃度:

- (1) Piperacillin: 最終濃度為 500 $\mu\text{g/ml}$ (Piperacillin Na)
- (2) Cefoperazone: 最終濃度為 500 $\mu\text{g/ml}$ (Cefoperazone Na)

以上兩種抗生素溶液限配製當日使用。

4. 抗生素-白蛋白結合溶液的配製:

精確量取適量的各抗生素貯存溶液於 10 ml 的試管，各加入 2.5 ml 濃度為 7 g/dl 的人體白蛋白溶液後，以 pH 7.4 緩衝液稀釋至最終容積為 5ml，以得到一系列不同濃度比的各抗生素與白蛋白混合溶液。經振盪混合機充分混合後於 37°C 的振搖水浴中加熱一小時以得平衡的抗生素與白蛋白結合溶液。

(二) 分析步驟:

1. 錐型超過濾膜(membrane cone)的處理:

預先將六個的濾膜浸漬於所欲過濾的抗生素儲備溶液中三十分鐘，以飽和膜上結合位置，經充分洗淨殘留抗生素後，於離心機中在半徑 6cm 之 SS-34 離心座中以 3000 rpm (600g) 的速率離心五分鐘，去掉膜上的水分備用。此膜每次用後應即以水沖洗並浸泡於 0.1% 氫氧化鈉溶液中或 5% 的鹽水中至少一小時，再以水沖洗，存放於 10% 酒精中以待再次使用。

2. 吸取各不同濃度比的抗生素與白蛋白結合平衡溶液 4ml 於經飽和的錐型濾膜中，然後套於離心管，於高速離心機中以 3000 rpm 的速率離心三十分鐘。

3. 吸取各超濾液(ultrafiltrate) 1 ml 於 4 ml 的試管內，各加定量的內標準品(參閱各抗生素含量測定法)，經充分振盪混合後，依各抗生素分析條件以高效液相層析儀測定各濾液中之抗生素濃度。

(三) 抗生素與白蛋白結合數據的表示

1. 結合率(Binding rate)

$$\% \text{ bound} = (Y-X/Y) \times 100$$

其中 X：自由態的抗生素濃度

Y：抗生素總濃度。

2. 最大結合位數與結合常數(maximum number of binding sites and association constant):

應用 Benesi-Hildebrand 雙倒數作圖法:

$$1/r = 1/n + 1/nk \times 1/[D]$$

其中，[D]：自由態抗生素濃度。

r：每摩爾白蛋白結合抗生素的摩爾數。

n：最大結合位數。

k：結合常數。

三、膽紅素與抗生素對人體白蛋白競爭性結合測定:

(一) 溶液的配製:

1. 膽紅素溶液(1000 $\mu\text{g/ml}$)的配製: 精確稱取本品 100mg 於 10ml 燒杯中，以 50 ml 0.025N 氫氧化鈉溶液溶解，並以 0.1 N 鹽酸溶液調整 pH 至 8.8，移入 100ml 褐色容量瓶中，並以 pH 8.8 磷酸緩衝液將燒杯內殘留的膽紅素洗入容量瓶內，再稀釋至刻度。配製過程儘量縮短暴露空氣中的時間，並避免光線的直射。此溶液必須避光貯藏，限於配製當日使用。
2. 膽紅素與抗生素及白蛋白結合溶液之配製:
 - (1) 固定膽紅素濃度為 20 mg/dl: 精確量取適量的各抗生素儲備溶液於 10ml 的試管中，各加入 2.5ml 的 7g/dl 的人體白蛋白溶液與 1 ml 1000 $\mu\text{g/ml}$ 的膽紅素溶液後以 pH 7.4 緩衝液稀釋至最終容積為 5ml，以得一系列不同濃度比的膽紅素與抗生素及白蛋白混合溶液。經振盪混合機充分混合後於 37°C 的振搖水浴中加熱一小時以得平衡的結合溶液。
 - (2) 固定抗生素濃度: 精確量取一定量的各抗生素儲備溶液於 10ml 的試管中，各加入 2.5ml 的 7g/dl 的人體白蛋白溶液，並於各試管中加入適量的膽紅素溶液，後以 pH 7.4 緩衝液稀釋至最終容積為 5ml，以得一系列不同濃度比之膽紅素與抗生素及白蛋白混合溶液。經振盪充分混合後於 37°C 的振搖水浴中加熱一小時以得平衡的結合溶液。

(二) 操作步驟: 同結合常數之測定

四、抗生素的濃度測定:

(一) 校正曲線的製定:

1. 標準溶液的配製: 兩種抗生素的配製除了不加入白蛋白溶液外，其餘

配製程序如前。此標準溶液並依前法同樣操作，以所得超過濾液供製定校正曲線。

2. 內標準溶液(Internal Standard Solution)的配製:

Cephadrine 溶液: 精確稱取本品 15mg 於 100ml 容量瓶中，以水溶解並稀釋至刻度，振搖均勻後，精確量取此液 40ml 於另一支 100ml 容量瓶中，再以水稀釋至刻度，此溶液最終濃度 15 μ g/ml，為測定此二種抗生素之內標準溶液。

3. 移動相溶液的配製:

(1) 0.01N 醋酸鹽緩衝液(pH4.8): 取 0.2M 醋酸鈉溶液 59 ml 與 0.2M 醋酸溶液 41ml 混合，以 0.1N 氫氧化鈉或醋酸溶液調整 pH 值至 4.8，以水稀釋至 2000ml。

(2) 分別精確量取(1)液各 650ml 與 750ml，各加 350ml 與 250ml 的甲醇，混合後，分別減壓去氣泡並經 0.45 μ m 過濾膜減壓過濾。前者為測定 piperacillin，後者為測定 cefoperazone 時之移動相溶液。

4. 操作步驟:

(1) 高效液相層析儀的操作依常法行之。各抗生素之分析條件如表(二)。

(2) 精確量取各種溶液之超過濾液 1ml 於 4ml 試管中並以移液管精確加入 0.5ml 的內標準溶液，振盪混合後，以自動注射器精確量注射 50 μ l 於管柱內。

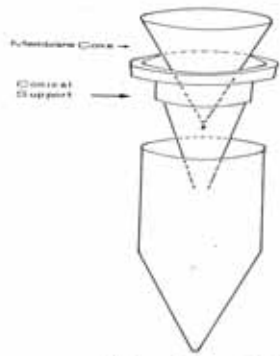
(3) 由標準品與內標準品之相對波峰面積值，以標準品與內標準品之波峰面積比為縱軸(ordinate)，各標準溶液濃度為橫軸(abscissa)，以 sigma plot 繪圖軟體，以直線迴歸求得 $Y = ax + b$ 之校正曲線。

(二) 超過濾液中自由態抗生素濃度之測定: 依製定校正曲線之操作步驟行之，並由校正曲線計算濃度。

表(二) 兩種抗生素的高效液相層析條件

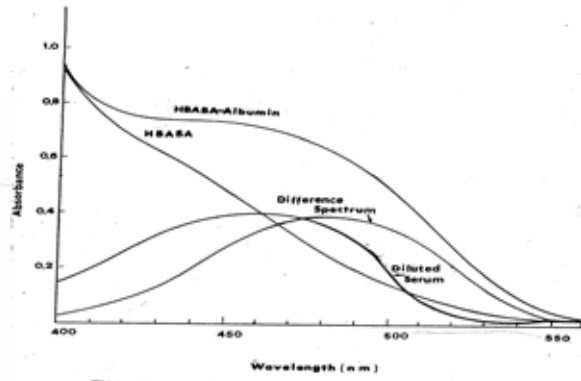
HPLC conditions	Piperacillin	Cefoperazone
Column : Lichrosorb RP-18 (10 mm, 250 x 4 mm)	V	V
Eluent: MeOH/acetate buffer (0.01 N, pH 4.8)	35/65	25/75
Flow Rate (ml/min.)	1.5 ml	1.5 ml
Detector: UV 254 nm	V	V
Sensitivity (AUFS)	0.1	0.1
Internal standard	Cephadrine	Cephadrine

結果與討論



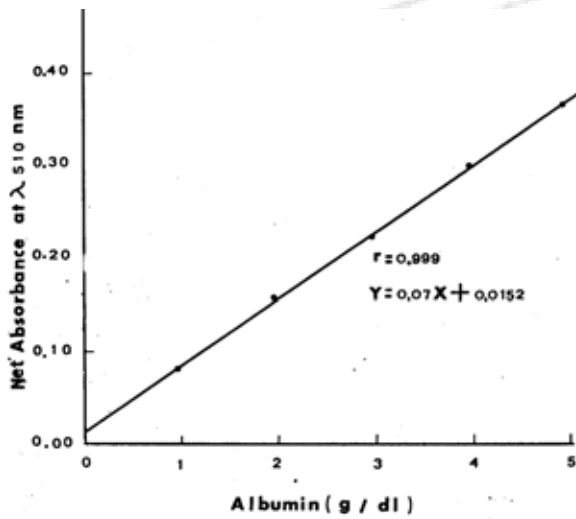
圖(一) 錐形超過濾膜

圖(一) 錐形超過濾膜

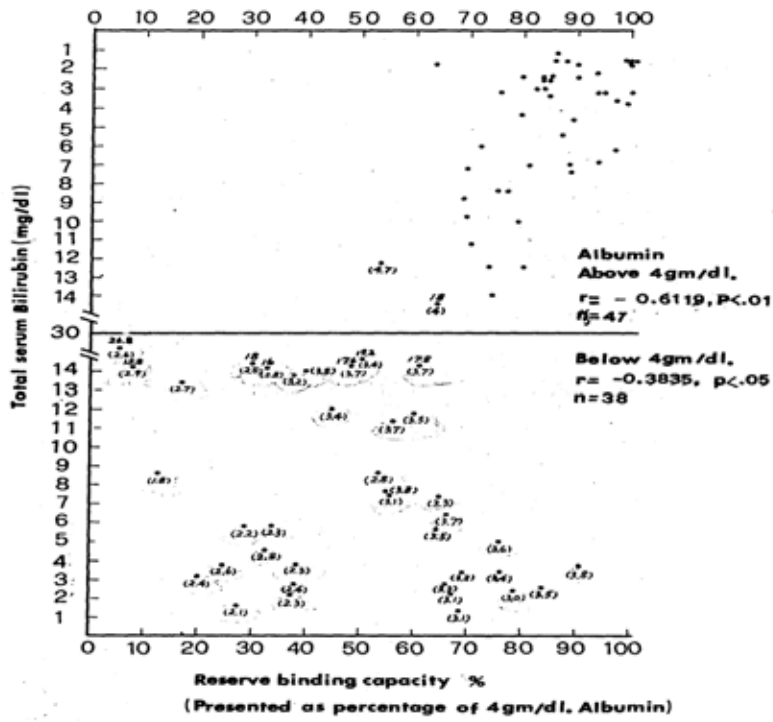


圖(二) 結合態與未結合 HBASA 染料及高胆紅素血清稀釋液之吸收光譜

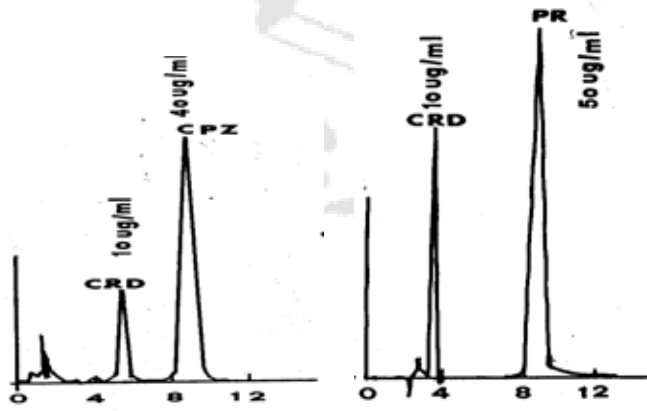
HBASA : 3 ml. of 3×10^{-6} M HBASA + 0.1 ml. of H₂O
 HBASA-Albumin : 3 ml. of 3×10^{-6} M HBASA + 0.1 ml. of 4 gm/dl albumin solution.
 Diluted serum : serum (total bilirubin : 22 mg/dl) 0.1 ml + 3 ml. of diluting buffer.



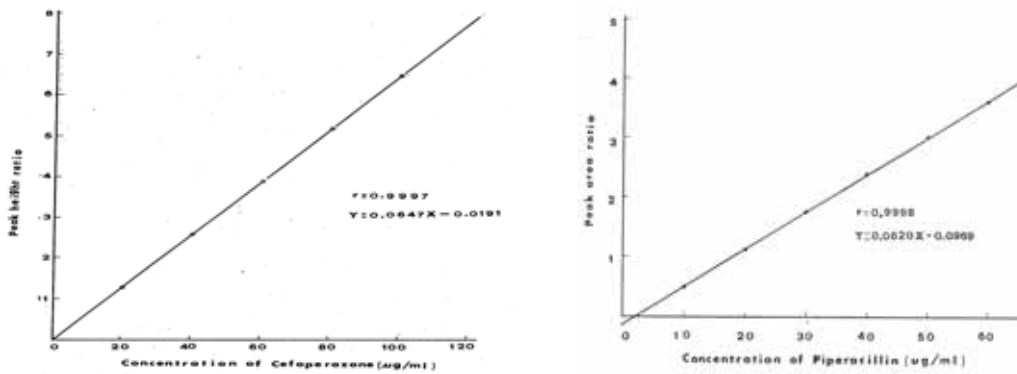
圖(三) 白蛋白濃度與染料-白蛋白結合溶液淨吸光度之間的直線關係



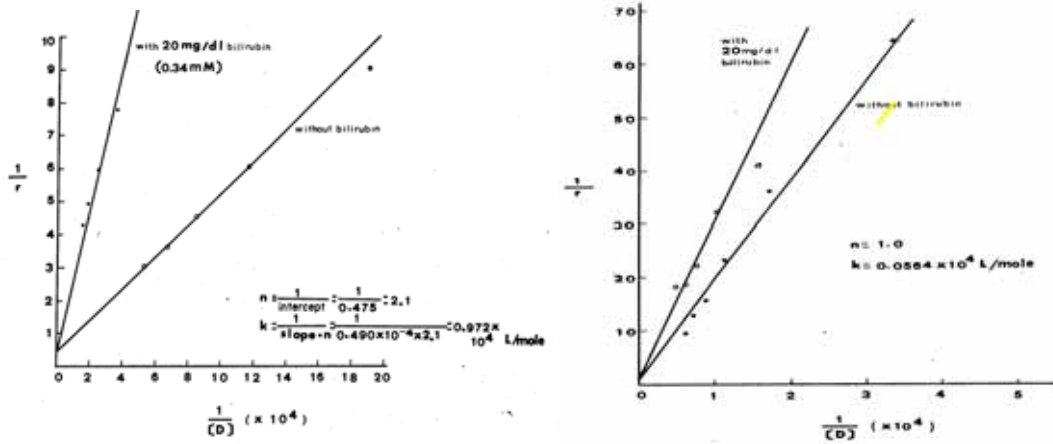
圖四 黃疸病人血清中胆紅素濃度與其存留白蛋白結合能力的關係



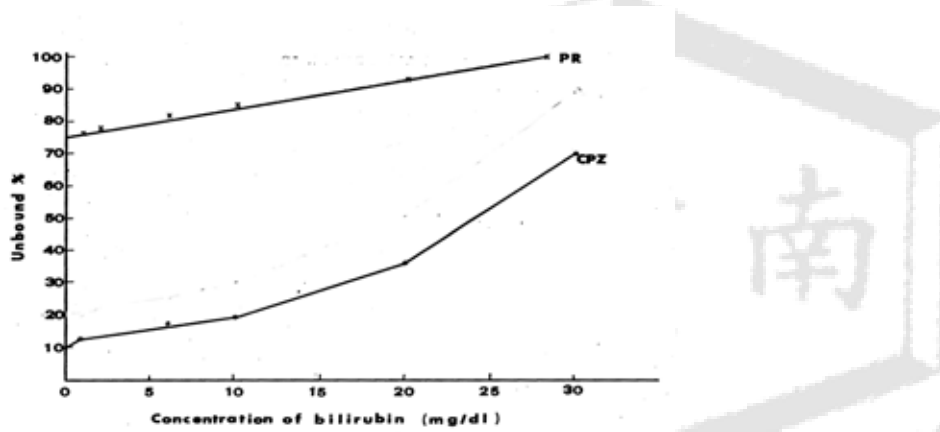
圖五 Cefoperazone (CPZ)與Piperacillin (PR)及內標 Cephadrine (CRD) 之高效液相層析圖



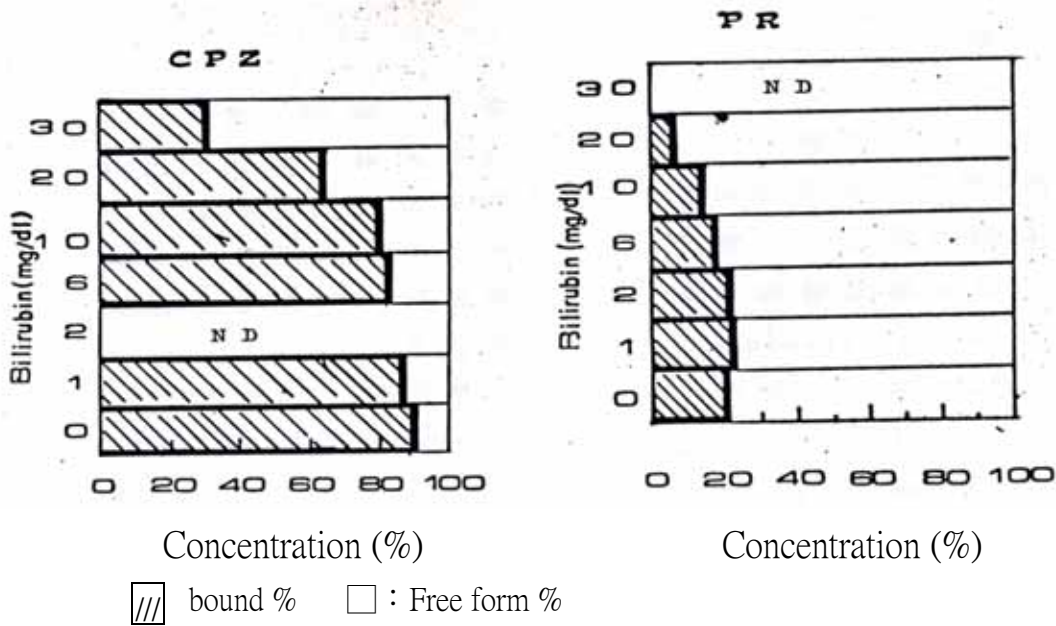
圖六 Cefoperazone 與 Piperacillin 之校正曲線



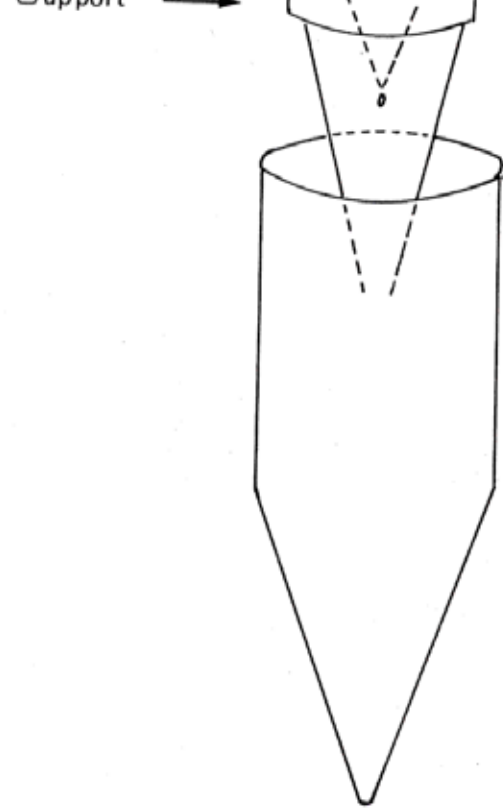
圖七 Cefoperazone、Piperacillin 與人體血清白蛋白之結合作用及膽紅素對其結合作用之抑制作用



圖八 改變膽紅素濃度對 Cefoperazone 及 Piperacillin 與人體血清白蛋白結合作用的影響



九 比較不同濃度膽紅素對 Cefoperazone 及 Piperacillin 與血清白蛋白結合之取代能力



合力越低，顯示其留存蛋白

濃度的取代，而降低蛋白結
紅素的影響越小。

受膽紅素的取代影響而顯著
其藥物動態必有極大影響。
驗證實。

圖(一) 錐型超過濾膜

