

微透析技术在药物-蛋白结合研究中的应用

徐陆忠, 柳琳, 魏颖慧, 李范珠* (浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

摘要: 目的 介绍微透析技术在药物-蛋白结合研究中的应用。方法 通过查阅近年来国内外相关文献, 概述微透析技术的基本原理、特点、探针及影响探针相对回收率的主要因素, 并重点介绍其在药物-蛋白结合研究中的应用。结果与结论 与平衡透析法、超滤法相比, 微透析技术是一项新兴的在体或离体取样技术, 在药物-蛋白结合研究中具有显著的优越性和广阔的应用前景。

关键词: 微透析技术; 药物-蛋白结合; 影响因素; 体外; 体内

中图分类号: R9-39

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693 (2009) 05-0364-05

The Application of Microdialysis Technique in the Study of Drug-protein Binding

XU Luzhong, LIU Lin, WEI Yinghui, LI Fanzhu* (College of Pharmaceutical Science of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To introduce the application of microdialysis technique in the study of drug-protein binding. **METHODS** The principle and characteristics of microdialysis technique and the main influential factors of probe's relative recovery were summarized, and its application in the study of drug-protein binding was described in detail by consulting the recent literatures about microdialysis technique at home and abroad. **RESULTS AND CONCLUSION** Compared with equilibrium dialysis and ultrafiltration method, microdialysis, a new technique for the *in vitro* or *in vivo* sampling has significant advantages and broad prospects in the study of drug-protein binding.

KEY WORDS: microdialysis technique; drug-protein binding; influential factor; *in vitro*; *in vivo*

药物-蛋白结合 (drug-protein binding) 是一种快速的可逆过程, 血浆中药物的游离型和结合型之间保持着动态平衡关系。结合型药物不能透过血管壁向组织转运, 不能经肾小球滤过, 亦不能经肝脏代谢, 仅游离型药物才能从血液向组织转运, 在靶部位发挥药理作用, 进而进行代谢和排泄。此外, 药物与蛋白结合绝大部分是非特异性的, 不同药物间与同一蛋白的竞争性结合可使其中某一药物的游离浓度大大增加, 引起该药的表现分布容积、半衰期、肾清除率等一系列参数的改变, 最终导致药效改变或不良反应的产生。因此, 研究药物与蛋白的相互作用对药动学、药效学以及临床都有重要的理论和实践价值, 且对新药的研究和开发有着十分重要的意义。

研究药物-蛋白结合的传统方法有平衡透析法、超滤法、凝胶过滤法和超速离心法等, 其中以前两种方法最为常用^[1-2]。但平衡透析法需要大量药物, 且到达平衡需较长时间, 可能会引起药物与蛋白的

降解^[3]; 超滤法亦需要大量的药物, 且在过滤和离心过程中会因样品浓度及温度变化而使结合平衡受到干扰^[4-5]。微透析 (microdialysis, MD) 技术是近年来发展起来的一种新型生物取样技术, 其最大的优点是可在基本不干扰生物体内正常生命过程的情况下进行在体、实时取样和在线分析, 特别适用于研究药物与蛋白结合的动态变化^[6-7]。与传统方法相比显示了绝对的优势, 近年来受到广泛关注。笔者通过查阅近年来国内外相关文献, 概述MD技术的基本原理、特点、探针及影响探针相对回收率的主要因素, 并重点介绍其在药物-蛋白结合研究中的应用。

1 概述

1.1 基本原理

MD技术是利用物质沿浓度梯度扩散和半透膜对小分子化合物具有通透性的原理而设计的, 主要由微量灌流泵、探针、连接管、灌流液、连接管和样品收集器 (或在线连接分析仪器) 组成^[8-9]。具体

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772793); 浙江省卫生高层次创新人才培养工程; 浙江省新苗人才计划 (2007R40G2120044)

作者简介: 徐陆忠, 女, 硕士研究生 Tel: (0571)86613726 E-mail: xuluzhong_83@126.com *通信作者: 李范珠, 男, 博士, 教授 Tel: (0571)86633030 E-mail: lifanzhu@zjtcn.net

操作如下：将探针植入于血管或组织间隙，灌流液以一定的流速流经探针，血液或组织间液中的游离药物会沿浓度梯度扩散进入探针，而与大分子蛋白结合后的药物因受到膜屏障的阻碍作用不能通过透析膜，故采集到的样品中只含有游离药物^[10]。待结合平衡后，收集透析液，分析测定其中游离型药物浓度，并结合全血样本的采集，即可间接研究药物与蛋白的相互作用。

1.2 特点

与传统方法相比，MD 技术在药物-蛋白结合研究中具有以下显著特点：①取样量甚微，所带出的药物量较少，无体液损失，无体积迁移，使药物和蛋白浓度基本上保持恒定，对药物蛋白结合平衡的影响可忽略，相应所引起的样品损失和误差也较小。②可提供不含蛋白质、酶等大分子物质的样品，无需预处理便可直接进样分析测定游离药物浓度，可避免酶降解，提高样品的稳定性，且无离心过程，可控制影响实验变化的一个重要因素——温度，故所得结果具有更高的可靠性。③MD 探针活性膜表面积较小，与传统分离结合型与游离型药物的膜和装置相比，对药物的非特异性吸附较少，使测定结果更为准确。④能与多种分析检测仪器（HPLC、FIA、HPCE 等）联用，实现在线实时检测，易于自动化，不仅可大大减轻工作强度，而且能提高实验结果的精密度与准确度。⑤探针能稳定地植入静脉，给药后可在生理条件下研究体内药物与蛋白结合情况。⑥MD 技术的采集与分析过程既可在体又可离体进行，与微量及超微量分离、分析技术相结合，具有非常高的检测灵敏度和选择性，几乎适用于所有小分子活性物质的分析，是其他化学微环境在体检测方法所无法比拟的^[11]。

1.3 MD探针

血液MD技术常用的探针为柔性探针，其主要结构包括透析膜、熔融硅管、PE进液管和出液管。该类型探针具有足够的柔性，能固定在清醒动物的血管和内部器官柔软组织上，动物的移动对透析膜或血管壁的损伤很小，为体内药物与蛋白的结合研究创造了条件。1996年，Evrard等^[12]自制了一种静脉微透析用的柔性探针，于大鼠单剂量静脉注射氟吡洛芬20 mg·kg⁻¹后，以该探针为取样手段，在6 h内持续取样10次，每次250 μL，研究氟吡洛芬与血浆蛋白的结合情况。结果显示：氟吡洛芬的血浆蛋白结合率为98.0~99.5%，平衡时的结合参数为(0.194±0.162) mg·L⁻¹，蛋白结合程度表现出浓度

依赖性。

1.4 影响探针相对回收率的主要因素

应用MD技术研究药物-蛋白结合的实验过程中，探针的相对回收率（relative recovery, RR）是影响实验结果最重要的参数，反映透析液中待测化合物的浓度与其在样品基质中浓度比例关系。RR的测定方法有多种，常用的有零净通量法、反透析法和外推至零流速法等，其中以零净通量法应用较多^[13]。RR的影响因素主要有以下几个方面。

1.4.1 温度 Wang等^[14]在利用MD技术研究硫酸叔丁肾上腺素与牛血清白蛋白（bovine serum albumin, BSA）结合情况的实验中，考察了温度（23℃，37℃和40℃）对探针RR的影响。结果发现，RR随温度升高而增大。由于37℃灌流液有利于机体组织处于正常生理状态，故目前大多数药物-蛋白结合实验均在37℃条件下进行。

1.4.2 灌流速度 Huang等^[15]研究发现RR随着灌流速度的改变而呈反相变化，流速越低，药物在MD探针内外越易接近达到平衡，RR越大。当流速为1 μL·min⁻¹时，RR可达52.8%，但样本采集耗时，量甚少；当流速为10 μL·min⁻¹时，RR仅有12.5%，无法检测到药物。故流速的选择不仅要尽可能使RR大小适宜，而且要保证在取样时间间隔中收集足够体积的透析液用于药物浓度的测定。

1.4.3 灌流液 MD探针灌流液主要为水性灌流液，常用的有磷酸盐缓冲液（PBS）、林格氏液（Ringer's液）和柠檬酸葡萄糖抗凝溶液（ACD溶液），其组成、pH值、渗透压、离子强度与采样部位的内环境越接近越好^[16]。因灌流液水性组成的特性，故MD技术比较适宜于极性成分的取样，而对高脂溶性药物和高蛋白结合率药物的取样较困难。目前，研究者通过在灌流液中加入灌流液改性剂（如BSA、甘油、环糊精等）可增加高脂溶性药物的RR，有效解决了高脂溶性药物不适于MD取样的问题。Ao等^[17]通过在灌流液中加入β-环糊精的方法大大提高亲脂性药物及其代谢产物在MD取样中的RR。Wang等^[18]采用MD技术研究酮基布洛芬与人类血清白蛋白（human serum albumin, HSA）结合动力学的实验中，在灌流液中加入HSA，使RR提高到原来的5倍。

2 MD技术在药物-蛋白结合研究中的应用

2.1 建立药物-蛋白结合体外模型

建立药物-蛋白结合的体外模型，测定药物血浆蛋白结合率，了解其结合的紧密程度、结合部位、

结合位点数等问题, 不仅对于揭示药物代谢动力学问题, 指导临床合理用药具有重要的理论和实际价值, 同时对于进行药物分子设计、开发新药具有重要的指导意义。

2.1.1 测定药物血浆蛋白结合率 药物与大分子蛋白结合后直接影响药物在体内的分布及其药理作用的强弱, 故测定药物血浆蛋白结合率很有必要。Le等^[19]以褪黑激素类似物S20098为模型药物, 选择高低 ($2\ 000\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $10\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 两个浓度, 取家兔、大鼠、猴与人的血浆, 研究药物-蛋白结合情况。将经零净通量法校正过的同心柔性探针 (外径 $235\ \mu\text{m}$, 膜长 $25\ \text{mm}$, 截留分子量 $6\ 000\ \text{Da}$) 放入 $20\ \text{mL}$ 药物-血浆混合溶液中, 以Ringer's液灌流, 灌流速度为 $1\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 待结合平衡后收集透析液测定游离药物浓度, 结合对应透析介质中总的血浆药物浓度计算血浆蛋白结合率。结果发现, S20098与家兔、大鼠、猴、人的血浆蛋白都有明显结合, 其中与人、家兔的血浆蛋白结合率不存在浓度依赖性, 与大鼠、猴的血浆蛋白结合率却具有浓度依赖性, 提示药物与蛋白的结合特性与血浆来源有关。由于BSA与HSA的结构相似, 二者的氨基酸序列高度相似, 不同氨基酸均为保守性替换, 且BSA价廉易得, 故目前人们常研究药物-BSA的结合情况, 作为对药物-HSA结合情况的参考。

随后, Gao等^[20]采用MD技术测定平阳霉素 (PYM) 与犬血浆蛋白的结合率, 结果发现, PYM的血浆蛋白结合率随着PYM浓度的增加而降低。张英丰等^[21]以MD技术测定药物血浆蛋白结合率来评价体内MD取样的可行性。药物浓度分别为 $72\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $132\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $180\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 探针RR分别为26.26%、26.44%和26.22%; 药物血浆蛋白结合率分别为16.43%、17.22%和15.80%。结果表明探针RR在所研究的药物浓度范围内及取样周期内保持了相对稳定, 不同浓度青藤碱大鼠体外血浆蛋白结合率变化不大, 说明采用MD技术研究青藤碱在大鼠体内药动学过程是可行的。

2.1.2 测定药物-蛋白结合常数、结合位点数 结合常数的测定可了解药物与蛋白结合强度大小, 结合位点数的测定有助于了解药物与蛋白结合机制以及药物间相互取代的机制, 可预测药物间竞争结合的可能性。

Cao等^[22]将MD技术与HPLC-ECD (ECD的检测限为 2.0×10^{-7}) 联用, 研究了6-巯基嘌呤 (6-MP) 与BSA的相互作用。当灌流速度 $>5.0\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 时, RR

太低以致无法检测到6-MP的含量; 选用灌流速度为 $1.0\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 时, 6-MP的RR为34.5%。利用Scatchard方程处理数据, 得到6-MP-BSA的结合常数和结合位点数分别为 $3.97\times 10^3\ \text{M}^{-1}$ 和1.51。结果表明, 6-MP与BSA结合强度较弱且仅有一类结合位点, MD-HPLC组合技术用于研究药物与蛋白的相互作用是可行的, 具有简单、快速、易于自动化的优点, 特别适应当今技术微型化的发展趋势, 为药物-蛋白结合研究提供了一种简单且可靠的新方法。

Chen等^[23]将MD技术与流动注射化学发光法 (MD-FIA-CL) 联用, 成功测定了甲硝唑 (MTZ)-HSA的结合常数、结合位点数和结合率, 建立了可靠的体外结合模型。先将MTZ-HSA以不同摩尔比 ($0.4:1$, $0.6:1$, $0.8:1$, $1:1$, $1.2:1$) 混合, 用 $0.067\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH7.4的PBS缓冲液溶解, 于 37°C 恒温水浴至少 $10\ \text{min}$, 为了保护透析膜, 在探针放入混合溶液前, 要用灌流液清洗探针几分钟, 以除去探针中的空气和有机溶剂。然后将经校正的探针放入MTZ-HSA混合溶液中, 以PBS缓冲液灌流, 灌流速度 $5\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 待结合平衡 $30\ \text{min}$ 后开始收集透析液, 直接进样分析, 利用Scatchard方程处理数据得到MTZ-HSA的结合常数K为 $1.5\times 10^3\ \text{M}^{-1}$, 结合位点数为1.89, 结合率为20%。结果表明, MTZ与HSA结合属轻度结合, MD-FIA-CL在线定量分析能弥补离线分析的不足, 使小容量样品的收集、分析同步进行, 消除操作过程中样品的挥发所带来的误差, 使测定结果更为准确、真实。

2.1.3 体外药物间与蛋白的竞争作用 研究体外药物间与蛋白的竞争作用, 为预测药物间在体内与蛋白的相互作用提供了理论依据, 对调整药物剂量, 预测毒性, 并最终防止毒性的产生等均具有重大意义。汪海林等^[24]以酮基布洛芬 (KP) 为模型药物, 采用MD技术考察了KP与布洛芬、华法林两种药物间与HSA结合的置换效应。结果发现, KP-HSA的结合率随布洛芬浓度的增加而降低, 较低浓度 ($50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的布洛芬即可使酮基布洛芬的血浆蛋白结合率降低8个百分点, 而与华法令浓度变化关系不显著。相反, 当华法令浓度为 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, KP-HSA的结合率稍有增加, 表明布洛芬与KP的一级结合位点相同, 两者存在很强的竞争作用; 而华法令与KP的一级结合位点不同, 彼此没有明显的置换效应, 在一定浓度区间甚至可能存在协同作用。

2.2 药物-蛋白结合的体内研究

采用MD技术研究药物在体内与蛋白的结合情

况,能考虑药物与其代谢物的相互作用、血细胞对药物的摄取等因素,故能更真实地评价药物的体内过程,这是传统方法所不能做到的。Le等^[19]以自由、清醒的Wistar大鼠为实验动物模型,利用MD技术对褪黑激素S20098与大鼠血浆蛋白的结合情况进行了在体和离体实验。先将Wistar大鼠麻醉,将一套管插入大鼠左颈静脉用于给药,另一套管插入左颈动脉用于收集全血样品,MD探针埋植入右颈静脉用于收集透析液。待大鼠术后24 h,以恒定速度静脉给药使其维持稳态血药浓度为30 ng·mL⁻¹,以Ringer's液灌流,灌流速度1 μL·min⁻¹,达到结合平衡后收集20 μL透析液用于测定游离药物浓度,静脉给药后1 h, 2 h, 6 h收集三个全血样品用于测定总血浆药物浓度,在体和离体实验药物的血浆蛋白结合率分别为74.0%和75.6%,探针RR分别为(91.3±5.6)%和(100.5±2.6)%,只有用在体RR来校正药物浓度才能得到真实的体内药物浓度,进而真实反映药物在体内与蛋白的结合情况。

Tsai等^[25]以雄性SD大鼠为实验动物模型,利用在体MD技术研究环丙沙星、环孢菌素A与蛋白结合的竞争作用。单剂量静脉注射20 mg·kg⁻¹环孢菌素A后,再分别静脉注射高低两个剂量的环丙沙星(50 mg·kg⁻¹、20 mg·kg⁻¹),将MD探针(外径150 μm,半透膜长10 mm,截留分子量13 000 Da)插入大鼠颈静脉,以ACD液灌流,灌流速度2 μL·min⁻¹,每隔10 min收集透析液,测定游离药物浓度。结果表明,同时用药时血浆中高低两个剂量环丙沙星的浓度与单独用药时相比都有显著增加,环孢菌素A对环丙沙星的蛋白结合具有显著竞争抑制作用。

2.3 中药多组分体系-蛋白相互作用研究

MD取样可提供不含蛋白质、酶等大分子物质的样品,无需提纯样品便可直接进样分析测定游离药物浓度,为中药多组分体系-蛋白相互作用研究提供了可能,同时对中药活性成分的体外筛选有很好的指导作用。

Qian等^[26]采用MD技术与高效液相色谱-二极管阵列检测/质谱联用(HPLC-DAD/MS)的方法,成功地从金银花中同时测得多种组分共存时与BSA的结合度,并与组分单独存在时的结合度进行了比较。结果绿原酸、木犀草素-3-O-α-D葡萄糖苷和4,5-二咖啡酰奎尼酸与BSA的结合度低于单个组分时的结合度,而咖啡酸和紫萼皮苷与BSA的结合度高于单个组分时的结合度。表明:中药多组分药物间与BSA结合具有竞争抑制或协同促进作用,各组分

与BSA的结合能力随着其所含极性基团的增多而减弱。此外,4-咖啡酰奎尼酸和3,5-二咖啡酰奎尼酸与已证实的活性成分具有相似的结合度,可预测其可能是金银花的活性有效成分,故对中药活性成分的体外筛选具有很好的指导作用。

Wen等^[27]采用同法成功地用于当归补血汤中多成分与BSA的结合,从当归补血汤提取物中筛选出10种与BSA具有适当结合系数的成分,并比较了8个化合物单独与血浆蛋白作用和在复方中结合系数的差别,结果充分表明中药的多成分、协同作用特点。同时考察了灌流液pH值(pH 6.0、7.4和8.9)对各组分的RR和与BSA结合度的影响。结果表明:灌流液pH值与该组分酸碱度越接近,越利于该组分处于分子状态,则该组分的RR越高,与BSA的结合度也越高。此外,各组分与BSA的结合范围与BSA的浓度有关,BSA浓度为0.3 mmol·L⁻¹和0.6 mmol·L⁻¹时,结合范围分别为6.3%~59.8%与6.9%~86.6%。

3 总结与展望

研究药物-蛋白结合,特别是对血浆蛋白结合率高的药物、有毒药物或同时使用与蛋白具有竞争性结合的药物显得尤为必要。MD技术以其“在线、实时、活体、微量、高效、自动化”的优点,在药物与蛋白结合的体内外研究中具有显著的优越性,但其自身也存在不足之处:如所取样品量少,对分析仪器的灵敏度要求较高;MD探针的校正问题等。但随着新型探针的不断研究与开发,高灵敏度分析仪器的日益发展与完善,相信MD技术在药物-蛋白结合研究中将具有更大的发展潜力和应用前景。

REFERENCES

- [1] LIN Z J, MUSIANO D, ABBOT A, et al. *In vitro* plasma protein binding determination of flunarizine using equilibrium dialysis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 37(4): 757-762.
- [2] TANG Y H, ZHU H Y, ZHANG Y Y, et al. Determination of human plasma protein binding of baicalin by ultrafiltration and high-performance liquid chromatography[J]. *Biomed Chromatogr*, 2006, 20(10): 1116-1119.
- [3] TSAI T H. Assaying protein unbound drugs using microdialysis techniques[J]. *J Chromatogr B*, 2003, 797(1-2): 161-173.
- [4] HUANG Y M, ZHANG Z J. Binding study of drug with bovine serum album using a combined technique of microdialysis with flow-injection chemiluminescent detection[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 35(5): 1293-1299.
- [5] HERRERA A M, SCOTT D O, LUNTE C E. Microdialysis sampling for determination of plasma protein binding of drugs[J]. *Pharm Res*, 1990, 7(10): 1077-1081.

- [6] WANG C, LV J G, ZHANG Z J. Spectrofluorimetric analysis combined with microdialysis sampling for studying binding of thioguanine to protein[J]. Acta Chem Sin(化学学报), 2002, 60(9): 1672-1676.
- [7] ZHANG L Y, LI F Z. Application of microdialysis technique in tissue-targeted distribution and metabolism of drugs[J]. Chin New Drugs J(中国新药杂志), 2006, 15(24): 2103-2106, 2146.
- [8] YU W Y, CHENG Q Y, FENG J, et al. Microdialysis for pharmacokinetic-pharmacodynamic studies [J]. Pharmazie, 2007, 62(12): 883-891.
- [9] JIN G, CHENG Q Y, FENG J, et al. On-line microdialysis coupled to analytical system [J]. J Chromatogr Sci, 2008, 46(3): 276-287.
- [10] TSAI T H. Concurrent measurement of unbound genistein in the blood, brain and bile of anesthetized rats using microdialysis and its pharmacokinetic application [J]. J Chromatogr A, 2005, 1073(1-2): 317-322.
- [11] GUO M, SU X, KONG L, et al. Characterization of interaction property of multicomponents in Chinese Herb with protein by microdialysis combined with HPLC [J]. Anal Chem Acta, 2006, 556(1): 183-188.
- [12] EVARD P A, CUMPSR J, VERBEECK R K. Concentration-dependent plasma protein binding of flurbiprofen in the rat: an *in vivo* microdialysis study [J]. Pharm Res, 1996, 13(1): 18-22.
- [13] VERBEECK R K. Blood microdialysis in pharmacokinetic and drug metabolism studies [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2000, 45(2-3): 217-228.
- [14] WANG Z P, ZHANG Z J, FU Z F, et al. Flow-injection chemiluminescence detection for studying protein binding of terbutaline sulfate with on-line microdialysis sampling[J]. J Pharm Biomed Anal, 2003, 33(4): 765-773.
- [15] HUANG Y M, ZHANG Z J, ZHANG D J, et al. Flow-injection analysis chemiluminescence detection combined with microdialysis sampling for studying protein binding of drug[J]. Talanta, 2001, 53(4): 835-841.
- [16] GUO P, WANG X M, LIU L S, et al. Determination of methotrexate and its major metabolite 7-hydroxymethotrexate in mouse plasma and brain tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43: 1789-1795.
- [17] AO X, STENKEN J A. Water-soluble cyclodextrin polymers for enhanced relative recovery of hydrophobic analytes during microdialysis sampling[J]. Analyst, 2003, 128(9): 1143-1149.
- [18] WANG H L, WANG Z X, LU M L, et al. Microdialysis sampling method for evaluation of binding kinetics of small molecules to macromolecules[J]. Ana Chem, 2008, 80(8): 2993-2999.
- [19] LE QUELLEC A, DUPIN S, TUFENKJI A E, et al. Microdialysis: an alternative for *in vitro* and *in vivo* protein binding studies [J]. Pharm Res, 1994, 11(6): 835-838.
- [20] GAO Z B, DING P T, XU H, et al. The determination of *in vitro* pingyangmycin hydrochloride plasma protein binding by microdialysis[J]. Pharmazie, 2007, 62(2): 115-116.
- [21] ZHANG Y F, ZHOU L L, LI R. Determination *in vitro* of rat plasma protein binding rate of sinomenine by using microdialysis method[J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2006, 41(9): 909-912.
- [22] CAO X N, LIN L, ZHOU Y Y, et al. Study of the interaction of 6-mercaptopurine with protein by microdialysis coupled with LC and electrochemical detection based on functionalized multi-wall carbon nanotubes modified electrode[J]. J Pharm Biomed Anal, 2003, 32(3): 505-512.
- [23] CHEN H, GONG Z J, ZHANG Z J. Coupling microdialysis with flow-injection chemiluminescence detection for a protein-drug interaction study[J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 41(4): 1412-1417.
- [24] WANG H L, ZOU H F, ZHANG Y K. Microdialysis-liquid chromatographic study on competitive binding of drugs to protein[J]. Sci Sin(B)(中国科学(B 辑)), 1998, 28(1): 71-77.
- [25] TSAI T H, WU J W. Pharmacokinetics of ciprofloxacin in the rat and its interaction with cyclosporin A: a microdialysis study[J]. Anal Chim Acta, 2001, 448(1): 195-199.
- [26] QIAN Z M, WEN X D, LI H J, et al. Analysis of interaction property of bioactive components in Flos Lonicerae Japonicae with protein by microdialysis coupled with HPLC-DAD-MS [J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(1): 126-130.
- [27] WEN X D, QI L W, CHEN J, et al. Analysis of interaction property of bioactive components in Danggui Buxue decoction with protein by microdialysis coupled with HPLC-DAD-MS [J]. J Chromatogr B, 2007, 852(1-2): 598-604.