

高效液相色谱法研究蓝萼甲素与大鼠血浆蛋白的结合率

曹露晔¹, 陈子君², 李云森³, 李仪奎²(1. 广东化工与制药职业技术学院, 广东 广州 510520; 2. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203;
3. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要:目的 研究蓝萼甲素与大鼠血浆蛋白的结合。方法 采用大鼠血浆平衡透析法, HPLC法测定透析袋两侧溶液中蓝萼甲素的质量浓度, 计算蓝萼甲素的血浆蛋白结合率。结果 蓝萼甲素在质量浓度为20、10、1 $\mu\text{g/mL}$ 时与血浆蛋白结合率分别为74.46%、77.87%、75.29%。结论 高效液相色谱法用于蓝萼甲素的生物样品测定具有简便、快速、灵敏与选择性高的特点。蓝萼甲素具有中等强度的血浆蛋白结合率。

关键词: 蓝萼甲素; 蛋白结合率; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)05-0693-03

Determination of glaucocalyxin A by HPLC and its protein binding rate in plasma of rat

CAO Lu-ye¹, CHEN Zi-jun², LI Yun-sen³, LI Yi-kui²(1. Guangdong Vocational College of Chemical Engineering and Pharmaceutics, Guangzhou 510520, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;
3. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: **Objective** To study the protein binding rate of glaucocalyxin A in plasma of rat. **Methods** The plasma balance dialysis was used. An HPLC for the quantitative determination of glaucocalyxin A was presented and used to calculate the protein binding rate in plasma of rat. **Results** There were protein binding rate results of 74.46%, 77.87%, and 75.29% at three various concentrations 20, 10, and 1 $\mu\text{g/mL}$ of glaucocalyxin A in plasma of rat. **Conclusion** The HPLC method used to determine glaucocalyxin A is simple, rapid, and sensitive with good specificity, precision and accuracy, and glaucocalyxin A has medium capacities in protein binding rate in plasma of rat.

Key words: glaucocalyxin A; protein binding rate; HPLC

蓝萼甲素是唇科香茶菜属植物蓝萼香茶菜 *Rabdosia japonica* (Burm. f.) Hara var. *glaucocalyx* (Maxim.) Hara 中的一个成分。蓝萼甲素在体外具有抑制血小板聚集作用, 可以开发作为血小板聚集抑制剂。蓝萼甲素在10 mg/kg 可显著增加⁸⁶Ru 的吸收, 提示具有改善微循环的作用^[1~3]。本课题组对蓝萼甲素在大鼠体内药动学过程进行了研究, 发现其分布和排泄较快。药物进入机体后能与体内多种生物高分子发生结合, 如药物与受体的结合、药物与核酸的结合等。药物与血浆蛋白的结合也是药物与生物高分子的一种结合, 与其他类型的结合之间存在一定的相关性, 因此药物与血浆蛋白的结合, 是药理学基础理论研究, 特别是分子药理学的重要研究内容之一。考虑到血浆蛋白结合对蓝萼甲素体内分布和排泄的影响, 本实验采用平衡透析法考察了

蓝萼甲素在大鼠血中的蛋白结合率, 以便于进一步研究蓝萼甲素的代谢和排泄过程。

1 仪器与材料

Agilent 110 高效液相色谱仪: 含四元高压泵、在线真空脱气机、柱温箱、20 μL 手动进样阀; 04/2-1 离心机(上海手术器械厂); 吹气式浓缩干燥器(汉邦科技有限公司); XW-80A 涡旋混合器(上海医科大学仪器厂); 0.45 μm 微孔滤膜(安谱公司); FA2004N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司); 管状半透膜(周长5 cm, 长10 cm, 上海西巴斯公司)。蓝萼甲素(HPLC 峰面积归一化法测定其质量分数大于99%)。内标物为8 β -hydroxy-eremophil-7,11-en-4,6(8,12)-diolide(中国科学院药物研究所馈赠, HPLC 峰面积归一化法测定其质量分数大于99%)。SD 大鼠, 体重220~250 g, 雌雄兼用, 由上海

收稿日期: 2006-08-05

基金项目: 国家科技部 863 计划“创新药物和中药现代化”新药博士基金资助课题(2003AA2Z3518)

作者简介: 曹露晔(1978—)女, 云南人, 上海中医药大学博士毕业, 主要从事抗炎免疫药理及药动学研究。

E-mail: yncly001@yahoo.com.cn

中医药大学实验动物中心提供,动物许可证:SYXK(沪)2002-00530。大鼠腹主动脉取血,肝素抗凝,离心(3 000 r/min)10 min,分离血浆备用。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 蓝萼甲素对照品溶液制备:取蓝萼甲素 10 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解,稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为 1 mg/mL 的贮备液。

2.1.2 内标溶液的配制:精密称取内标 40 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取上述储备液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,配成 40 μ g/mL 的内标溶液。

2.1.3 透析液配制:取磷酸二氢钠 3.12 g,氯化钠 8.8 g,加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液适量,调节 pH 值至 7.4,然后补水至 1 000 mL,即得 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液(内含 0.15 mol/L 氯化钠),作透析液。

2.2 色谱条件:色谱柱:Hypersil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μ m);流动相:甲醇-水(45:55);柱温:30 $^{\circ}$ C;体积流量:1 mL/min;进样量:20 μ L。见图 1。

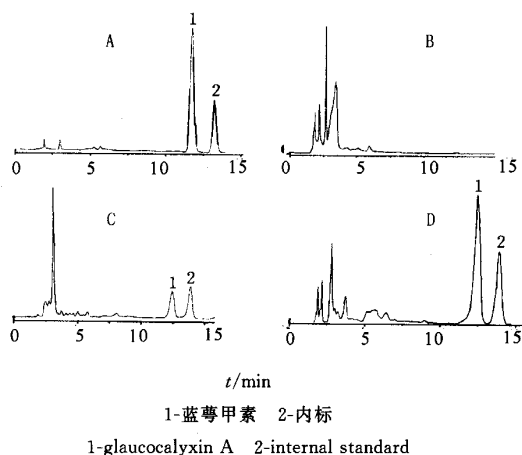


图 1 蓝萼甲素对照品和内标(A)、空白血浆(B)、蓝萼甲素对照品和内标的磷酸盐溶液(C)、蓝萼甲素对照品和内标的磷酸盐溶液的空白血浆(D)

Fig. 1 HPLC Chromatograms of glaucocalyxin A reference substance and internal standard (A), blank plasma (B), phosphatic buffer added glaucocalyxin A reference substance and internal standard (C), and blank plasma added glaucocalyxin A reference substance and internal standard (D)

2.3 血浆样品的处理:取大鼠血浆 0.5 mL,置 10 mL 具塞离心管中,精密加入 100 μ g/mL 内标溶液 10 μ L、冰醋酸 10 μ L,涡旋 10 s,精密加入乙醚 3

mL,涡旋 3 min,于 3 000 r/min 离心 10 min。精密吸取有机相 2 mL,在 60 $^{\circ}$ C 水浴中吹干。残渣加甲醇 100 μ L 溶解,过 0.45 μ m 微孔滤膜,即得。

2.4 线性关系考察

2.4.1 蓝萼甲素在大鼠血浆中的标准曲线:精密吸取不同体积的蓝萼甲素对照品溶液适量于 5 个具塞离心管中,以空白血浆配成含蓝萼甲素 0.2、0.5、1、2、5、10 μ g/mL 的溶液。置 10 mL 具塞离心管中,按 2.3 项下方法操作,取 20 μ L 进样分析。以蓝萼甲素峰面积与内标峰面积的比值对质量浓度进行线性回归,得标准曲线方程 $Y=0.2338X-0.01744$, $r^2=0.99935$,线性范围为 0.2~10 μ g/mL。

2.4.2 蓝萼甲素在磷酸缓冲液中的标准曲线:精密吸取不同体积的蓝萼甲素对照品溶液适量于 5 个具塞离心管中,以 pH 7.4 的透析液配成含蓝萼甲素 10、5、1、0.5、0.2 μ g/mL 的溶液。置 10 mL 具塞离心管中,按 2.3 项下方法操作,取 20 μ L 进样分析。以蓝萼甲素峰面积与内标峰面积的比值对质量浓度进行线性回归,得标准曲线方程 $Y=0.4263X+0.0763$, $r^2=0.9993$,线性范围为 0.2~10 μ g/mL。

2.5 平衡透析时间的确定:除试验样本外,另以 2 mL 透析液代替血浆,以相同方法操作,作为时间对照样本,以确定药物从袋内外自由扩散达到平衡的时间。结果 24 h 袋内外溶液中蓝萼甲素的质量浓度相等,表明扩散 24 h 已达到平衡,因此设定平衡透析时间为 24 h。

2.6 血浆蛋白结合率的测定^[4]:将管状透析袋一端结扎使不漏液,用移液管精密量取大鼠血浆样本 2 mL 加入透析袋中,注意不要使袋口污染血浆。折叠并用线结扎袋口,袋内保留少量空气,使透析袋能悬浮在透析液中。将两端扎牢的透析袋置于盛有 10 mL 透析液的广口瓶中,用线调节袋内外液面高度,使保持同一水平,排除液面差引起的液体流动,并注意不使透析袋靠着管壁,以免影响透析效果。加入蓝萼甲素储备液 20、10、1 μ L 至袋外透析液中,使其终质量浓度为 20~1 μ g/mL。最后用封口膜封住瓶口。到达平衡时间后,吸出袋外少量透析液,加等量 10% 高氯酸试剂,检查有无血浆蛋白漏出。若袋外透析液蛋白检查阳性,则该样本作废。取出透析袋,用滤纸吸干附着于袋外壁上的透析液,小心剪破透析袋,分别精密吸取 1 mL 血浆样本、1 mL 袋外透析液,置 10 mL 具塞离心管中,精密加入 40 μ g/mL 内标溶液 10 μ L,处理,测定袋内和袋外溶液中的蓝萼甲素的质量浓度,计算血浆蛋白结合率。结果见表 1。

表1 蓝萼甲素在大鼠血浆中的蛋白结合率($n=3$)

Table 1 Protein binding rates of glaucocalyxin A in plasma of rat ($n=3$)

蓝萼甲素的质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)			蛋白结合率/%
透析前血浆	透析后袋内溶液	透析后袋外溶液	
20	15.23±2.36	3.89±0.56	74.46
10	8.36±0.82	1.85±0.21	77.87
1	0.85±0.20	0.21±0.04	75.29

蛋白结合率=(袋内溶液中蓝萼甲素的质量浓度-袋外溶液中蓝萼甲素的质量浓度)/袋内溶液中蓝萼甲素的质量浓度 $\times 100\%$

3 讨论

目前测定药物血浆蛋白结合率的方法有平衡透析法、超滤法、凝胶过滤法、超速离心法和白蛋白微球测定法等^[5~8],其中平衡透析法是一种最常用的方法。本试验采用平衡透析法测定了不同质量浓度下蓝萼甲素的蛋白结合率,可为合理给药方案的设计提供参考。

平衡透析法的平衡温度一般可选在37℃,也可采用4℃恒温条件下测定。实验中发现在37℃下样本达到平衡时间较短,但是血浆被细菌污染,所以选择在4℃下进行。

比较了各种有机溶剂对血浆中蓝萼甲素的提取率,发现氯仿和乙醚的提取率相同,但是氯仿位于水下层,不方便吸取,所以采用了乙醚处理,方法简便,

且测定无干扰。

References:

- [1] Bin Z, Kun L, Jiang Y Y. Effects of glaucocalyxin A on PAF biosynthesis and arachidonic acid metabolism in washed rabbit platelets [J]. *Chin J Pharm Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1992, 6(1): 52-54.
- [2] Bin Z, Kun L. Inhibition by glaucocalyxin A of aggregation of rabbit platelets induced by AKP, arachidonic acid and platelet-activating factor, and inhibition of (3H)-PAF binding [J]. *Thromb Haemost*, 1992, 67(4): 458-460.
- [3] Bin Z, Kun L. Effects of glaucocalyxin A on aggregation and cAMP levels of rabbit platelets *in vitro* [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1993, 14(4): 346-350.
- [4] Xu S Y. *Experimental Methodology of Pharmacology* (药理学实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.
- [5] Xiong W B, Cai S H, Bao D Y, et al. Comparative study of the cephazolin plasma protein binding between Chinese neijiang pig and Chinese people [J]. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2003, 19(5): 596-597.
- [6] Wang H, Chen J M, Zhang Q M. Determination of physalcalcheal of baicalin [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2000, 17(2): 107-109.
- [7] Michael D, Reed P D. Influence of midazolam on the protein binding of Ketorolac [J]. *Current Therap Res*, 2001, 62(8): 558-561.
- [8] Fung E N, Chen Y H, Lau Y Y. Semi-automatic high-throughput determination of plasma protein binding using a 96-well plate filtrate assembly and fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2003, 795: 187-194.

通栓救心 pH 依赖型缓释胶囊在犬体内的药动学和药效学研究

于叶玲, 郑昕, 唐星

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 制备通栓救心 pH 依赖型缓释胶囊, 并进行犬体内药动学和药效学的研究。方法 以牡丹皮、川芎、香附的超临界 CO_2 萃取物及冰片为原料, 经 β -CD 包合固化后用粉末层积法制备含药微丸, 分别用 HPMC、Eudragit L-30D-55、Eudragit L100-S100(1:5)包衣制备 pH 依赖型延迟释药微丸, 将延迟类型不同的包衣微丸按预设剂量分别混合填充胶囊, 制得通栓救心 pH 依赖型缓释胶囊。采用血药浓度法测定方剂中指标性成分丹皮酚的血药浓度, 研究其药动学; 采用血清药理学方法研究其药效学。结果 血药浓度测定法表明通栓救心 pH 依赖型缓释胶囊和通栓救心片的体内平均滞留时间分别为 8.04、2.89 h, 相对生物利用度为 126.3%。药效学研究表明两者的平均效应维持时间分别为 11.27、5.94 h, 相对生物利用度为 129.1%。结论 通栓救心片在体内具有吸收快、消除快和作用维持时间较短的特点, 而通栓救心 pH 依赖型缓释胶囊在体内有起效迅速、药效持久、缓释的特点。

关键词: pH 依赖型缓释胶囊; 通栓救心片; 药动学; 药效学; 丹皮酚

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)05-0695-05

收稿日期: 2006-09-09

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)课题(2002AA223108)

作者简介: 唐星(1964—), 男, 陕西商县人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事药剂学研究。

Tel: (024)23986343 Fax: (024)23911736 E-mail: tangpharm@sina.com