

HPLC法测定丁香酚与大鼠血浆蛋白的结合率

杨晓宁¹, 禹玉洪¹, 李 阳¹, 李雪春²

(1. 亚宝药业集团股份有限公司研究院, 北京 102200; 2. 北京迈康斯德医药技术有限公司, 北京 102206)

摘要:目的 研究丁香酚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丁香酚的质量浓度, 计算丁香酚的血浆蛋白结合率。结果 丁香酚在质量浓度为144.62、28.92、5.78 $\mu\text{g/mL}$ 时与血浆蛋白结合率分别为52.43%、58.60%、61.49%。丁香酚具有中等强度的血浆蛋白结合率。结论 HPLC法测定丁香酚与血浆蛋白结合率试验具有简便、快速、灵敏与选择性高的特点。

关键词:丁香酚; 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(2010)03-391-03

丁桂儿脐贴是针对儿童常见病, 高发病腹泻腹痛的防治用药, 由丁香、肉桂、荜茇组成, 临床疗效好。丁香是本品的君药, 其所含挥发油具有抗菌、抗病毒、局麻、镇痛、清除氧自由基等作用^[1], 而其挥发油中丁香酚约占80%。本实验采用平衡透析法研究丁香酚与大鼠血浆的蛋白结合率^[2], 为进一步开展丁桂儿脐贴中丁香酚的药动力学研究提供参考。

1 仪器与材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪; TGL-14G 高速离心机(上海安亭科学仪器厂); Vortex-5 涡旋混合器(金坛市盛蓝仪器制造有限公司); 半透膜(直径2.7 cm, 长10 cm, 美国 Solarbio 公司)。

丁香酚对照品购自中国药品生物制品检定所, 批号 0725-200209; 内标物对羟基苯甲酸甲酯对照品购自中国药品生物制品检定所, 批号 100278-200402; 乙腈(色谱纯, 美国霍尼韦尔公司), 超纯水, 其他试剂均为分析纯。

Wistar 大鼠, 180~220 g, 雌雄并用, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 合格证号:

SCXX(京)2007-0001。

2 方法与结果

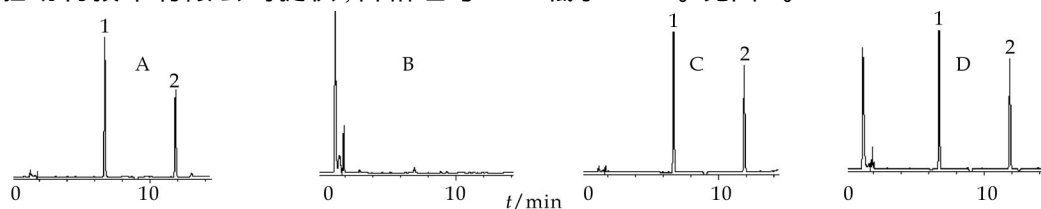
2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液的制备: 精密称取丁香酚对照品36.16 mg, 置10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.2 内标溶液的配制: 取对羟基苯甲酸甲酯14.80 mg, 精密称定, 置100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得148.00 $\mu\text{g/mL}$ 内标溶液。

2.1.3 透析液的配制: 取磷酸二氢钾2.72 g, 氯化钠8.8 g, 加入0.1 mol/L 氢氧化钠溶液适量, 调节pH值至7.4, 补水至1000 mL, 即得0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液(内含0.15 mol/L 氯化钠), 作为透析液。

2.2 色谱条件: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B), 梯度洗脱, 0~20 min(A20%~80%), 20~30 min(A80%~20%); 检测波长为260 nm; 进样量: 10 μL 。理论板数按丁香酚峰计算应不低于1500。见图1。



A-丁香酚对照品和内标 B-空白血浆 C-丁香酚对照品和内标的磷酸盐溶液 D-丁香酚对照品和内标的水溶液 1-内标 2-丁香酚
A-eugenol reference substance and internal standard B-blank plasma C-phosphatic buffer added eugenol reference substance and internal standard D-blank plasma added eugenol reference substance and internal standard 1-internal standard 2-eugenol

图1 大鼠血浆蛋白结合率的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of protein binding rate in plasma of rats

收稿日期: 2009-10-15

作者简介: 杨晓宁(1977—), 女, 北京人, 在职硕士, 工程师, 中药室项目经理, 从事研究方向为中药复方新药研发。

Tel: (010) 89705573 E-mail: yn3528@yahoo.com.cn

2.3 样品处理

2.3.1 血浆样品的处理:取大鼠血浆 200 μL , 加入内标溶液 50 μL 、0.1 mol/L 盐酸溶液 50 μL , 加甲醇 0.5 mL 沉淀血浆蛋白, 涡旋混合 30 s, 以 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 即得。

2.3.2 透析液样品的处理:取透析外液 200 μL , 加入内标溶液 50 μL 、0.1 mol/L 盐酸溶液 50 μL , 加入甲醇 0.5 mL, 涡旋混合 30 s, 以 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 即得。

2.4 线性关系考察^[3]

2.4.1 丁香酚在血浆中的标准曲线:取丁香酚的储备液适量, 用甲醇稀释成系列对照品溶液, 取 200 μL 空白血浆 6 份, 分别加入丁香酚的系列对照品溶液 50 μL , 配成相当于 723.11、144.62、28.92、5.78、1.16、0.23 $\mu\text{g/mL}$ 的血浆样品, 按血浆样品的处理项下方法操作, 取 10 μL 进样分析。以丁香酚与内标的峰面积比值对质量浓度进行线性回归, 计算回归方程为 $Y = 0.0016X + 0.0011$, $r = 0.9999$, 线性范围为 0.23 ~ 723.11 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4.2 丁香酚在透析液中的标准曲线:取丁香酚的储备液适量, 用甲醇稀释成系列对照品溶液, 取 200 μL 空白磷酸盐缓冲液 6 份, 分别加入丁香酚的系列对照品溶液 50 μL , 配成相当于 723.11、144.62、28.92、5.78、1.16、0.23 $\mu\text{g/mL}$ 的透析液样品, 照透析液样品的处理项下方法操作, 取 10 μL 进样分析。以丁香酚与内标的峰面积比值对质量浓度进行线性回归, 计算回归方程为 $Y = 0.0017X - 0.009$, $r = 0.9995$, 线性范围为 0.23 ~ 723.11 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5 准确度试验:分别在空白血浆、透析液中加入丁香酚对照品溶液, 使其质量浓度分别为 144.62、28.92、5.78 $\mu\text{g/mL}$, 每个质量浓度平行作 6 份, 按样品处理项下方法操作, 进行 HPLC 分析, 以当日的标准曲线计算丁香酚实测值, 计算相对回收率(相对回收率 = $C_{\text{实测}}/C_{\text{理论}} \times 100\%$)。结果血浆高、中、低 3 个质量浓度的相对回收率分别为 100.10%、97.74%、103.02%, RSD 分别为 3.63%、4.42%、5.49%。透析液高、中、低 3 个质量浓度的相对回收率分别为 97.86%、98.07%、99.88%, RSD 分别为 1.11%、2.44%、2.53%。

2.6 精密度试验^[4]

2.6.1 日内精密度试验:分别在空白血浆、透析液中加入丁香酚对照品溶液, 使其质量浓度分别为 144.62、28.92、5.78 $\mu\text{g/mL}$, 每个质量浓度平行作 6 份, 按样品处理项下方法操作, 进行 HPLC 分析,

每个样品进样 3 次, 在一天内用同台仪器和当日的标准曲线测定并计算日内精密度。结果血浆高、中、低 3 种质量浓度的 RSD 值分别为 0.40%、0.59%、4.58%;透析液高、中、低 3 种质量浓度的 RSD 值分别为 0.53%、0.46%、4.91%。

2.6.2 日间精密度试验:同 2.6.1 项下方法制备血浆样品及透析液样品, 每种质量浓度 6 份, 每份进样 3 次, 连续 3 d 用同一台仪器及当日标准曲线进行测定并求算日间精密度, 结果血浆高、中、低 3 种质量浓度的 RSD 值分别为 3.27%、2.07%、0.82%;透析液高、中、低 3 种质量浓度的 RSD 值分别为 4.69%、0.60%、3.29%。

2.7 稳定性试验

2.7.1 短期稳定性试验:分别在空白血浆、透析液中加入丁香酚对照品溶液, 使其质量浓度分别为 144.62、28.92、5.78 $\mu\text{g/mL}$, 每个质量浓度平行作 6 份, 按样品处理项下方法操作, 样品于室温下保存, 分别于 0、2、6、10、16、24 h 进行 HPLC 分析。以当日标准曲线计算, 结果血浆高、中、低 3 个质量浓度的 RSD 值分别为 0.57%、2.15%、3.79%;透析液高、中、低 3 个质量浓度的 RSD 值分别为 0.48%、2.30%、4.40%, 表明该样品在室温下 24 h 内稳定。

2.7.2 长期稳定性试验:同 2.7.1 项下方法制备高、中、低 3 个质量浓度的血浆样品及透析液样品, 每个质量浓度作 1 份, 样品于 -20℃ 保存, 分别于 0、1、2、3、4、6 d 取出解冻, 按样品处理项下操作, 进行 HPLC 分析。以当日标准曲线计算, 结果血浆 3 个质量浓度的 RSD 值分别为 3.73%、1.08%、3.36%;透析液 3 个质量浓度的 RSD 值分别为 1.20%、0.19%、2.47%, 表明该样品在 -20℃ 冷藏稳定。

2.8 提取回收率试验:取空白血浆 200 μL , 按血浆药物质量浓度配成 144.62、28.92、5.78 $\mu\text{g/mL}$ 3 种血浆样品, 按样品处理项下操作, 取 10 μL 进行 HPLC 分析;另取空白血浆 200 μL , 不加丁香酚对照品, 按样品处理项下操作, 吸取全部离心所得上清液, 分别加入丁香酚对照品溶液, 使其质量浓度分别为 144.62、28.92、5.78 $\mu\text{g/mL}$, 取 10 μL 进行 HPLC 分析, 计算提取回收率。结果 3 个质量浓度血浆样品的提取回收率分别为 84.38%、91.07%、92.92%。

2.9 血浆蛋白结合率的测定^[5,6]:将管状透析袋一端用线结扎使不漏液, 用移液管精密量取大鼠血浆

样本 1 mL 加入透析袋中,另一端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。将透析袋置于盛有 10 mL 透析液的广口瓶中,调节袋内外液面高度,使保持同一水平,透析袋不要靠着玻璃壁,以免影响透析效果。加入丁香酚对照品溶液适量,使透析外液的质量浓度分别为 144.62、28.92、5.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$,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%高氯酸溶液,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,取出血浆样品。分别精密吸取血浆样本 200 μL 、袋外透析液 200 μL ,按样品处理项下操作,分别测定透析袋内、外丁香酚质量浓度,计算蛋白结合率,结果见表 1。

蛋白结合率 = (袋内血浆药物质量浓度 - 袋外透析液药物质量浓度) / 袋内血浆药物质量浓度 $\times 100\%$

表 1 丁香酚在大鼠血浆中的蛋白结合率 ($n=3$)

Table 1 Protein binding rates of eugenol in plasma of rats ($n=3$)

丁香酚的质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)			蛋白结合率/ %
透析液浓度	袋内血浆药物浓度	袋外透析液药物浓度	
144.62	175.14 ± 11.65	82.89 ± 3.13	52.43 ± 4.71
28.92	41.00 ± 1.10	16.97 ± 0.37	58.60 ± 0.97
5.78	10.65 ± 0.22	4.10 ± 0.11	61.49 ± 1.78

2.10 平衡时间的确定^[7]:在透析袋内以 1 mL 透析液代替血浆,透析外液的质量浓度分别为 144.62、28.92、5.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$,测定透析袋内外丁香酚质量浓度,以当日标准曲线计算透析袋内外丁香酚质量浓度,以二者质量浓度比值确定药物从袋内外自由扩散达到平衡的时间。结果 40 h 袋内外溶液中丁香酚的质量浓度相等,表明扩散 40 h 已达到平衡,因此设定平衡透析时间为 40 h。结果见表 2。

表 2 平衡时间的考察 ($n=3$)

Table 2 Equilibrium time ($n=3$)

透析液浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	透析袋内外浓度比值		
	24 h	32 h	40 h
144.62	0.72	0.89	1.01
28.92	0.78	0.86	1.02
5.78	0.75	0.81	1.01

3 讨论

平衡透析法的平衡温度一般可选在 37 或 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,且丁香酚具有挥发性,试验数据不准确,所以选择在 4 下进行。

比较了甲醇、乙酸乙酯、盐酸溶液对血浆中丁香酚的提取率,发现使用甲醇和盐酸溶液组合提取率最高,处理方法简便,且测定无干扰。

本研究结果显示, HPLC 法测定丁桂儿脐贴中丁香酚与血浆蛋白结合率试验具有简便、快速、灵敏与选择性高的特点。丁香酚与大鼠血浆蛋白具有中等强度的蛋白结合率,在试验浓度范围内,蛋白结合率与透析液的药物浓度无关。

参考文献

- [1] 彭宅彪,张琼光,代虹健,等. 丁香酚的药理学研究进展[J]. 时珍国医国药,2006,17(10):2079-2081.
- [2] 刘睿,谢跃生,潘湘湘,等. 药物血浆蛋白结合率测定方法的研究进展[J]. 天津中医药,2007,24(6):526-528.
- [3] 斯陆勤,李高,陈鹰,等. 高效液相色谱法测定美林洛尔与人血浆蛋白的结合率[J]. 中国医院药学杂志,2006,26(3):253-255.
- [4] 曹露晔,陈子君,李云森,等. 高效液相色谱法研究蓝萼甲素与小鼠血浆蛋白的结合率[J]. 中草药,2007,38(5):693-695.
- [5] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 第2版. 北京:人民卫生出版社,2006.
- [6] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社,2005.
- [7] 刘杨,林建阳,陈晓辉,等. 白藜芦醇衍生物 RT-B 与小鼠血浆蛋白结合率的测定[J]. 中国新药与临床杂志,2008,27(6):403-406.

天津中草药杂志社开通网上在线投稿系统

天津中草药杂志社编辑出版的 4 种期刊《中草药》、Chinese Herbal Medicines、《现代药物与临床》(原刊名《国外医药·植物药分册》)、《药物评价研究》(原刊名《中文科技资料目录·中草药》)为提高稿件处理效率,更好地为广大读者和作者服务,从 2010 年 1 月开始,中草药杂志社开通网上在线投稿系统。

1. 在线投稿请登陆天津中草药杂志社网站: <http://www.中草药杂志社.中国> 或 www.tiprpress.com 点击进入 4 刊网页,在页面左侧有“作者登录”链接,第一次登陆按操作说明注册后进行在线投稿;作者可通过点击“作者登录”进行稿件查询。

2. 原则上不再采用电子邮件、纸质投稿。

在此,对广大作者、读者和编委对本刊长期以来的支持表示深深的感谢!

天津中草药杂志社