

HT-ED 联合 UPLC-MS/MS 技术分析白头翁皂苷 B4 的大鼠血浆蛋白结合率

贾佳¹, 欧阳辉^{1,2}, 何明玉¹, 何明珍^{1,2*}, 邱家明^{3*}, 冯育林^{1,2}, 杨世林^{1,2}

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 创新药物与高效节能降耗制药设备国家重点实验室, 南昌 330006; 3. 宜春学院, 江西 宜春 336000)

[摘要] 目的:建立血浆中白头翁皂苷 B4 的分析方法,测定白头翁皂苷 B4 大鼠血浆蛋白结合率。方法:采用 96 通道高通量平衡透析系统(HTD 96b)进行透析,利用 UPLC-MS/MS 测定透析内外液中白头翁皂苷 B4 的浓度,研究白头翁皂苷 B4 在大鼠血浆中的血浆蛋白结合率,使用 Waters XTerra MS C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 5 μm),流动相 0.1% 甲酸水溶液-乙腈梯度洗脱,流速 0.7 mL·min⁻¹,柱温 40 °C,进样量 5 μL。结果:白头翁皂苷 B4 在 5 ~ 2 000 ng·L⁻¹ 线性关系良好,其精密度 RSD 及准确度均 < 8.0%,重复性 RSD < 9.0%,稳定性的 RSD 均 < 15%;提取回收率和基质效应均在 80% ~ 115%。白头翁皂苷 B4 在低、中、高(6, 12, 24 mg·L⁻¹) 3 个质量浓度下大鼠血浆蛋白结合率分别为 (95.32 ± 0.37)%, (94.32 ± 0.63)%, (88.64 ± 0.37)%。结论:白头翁皂苷 B4 与大鼠血浆具有较强的蛋白结合率,且结合率不具有质量浓度依赖性。

[关键词] 白头翁; 白头翁皂苷 B4; 血浆蛋白结合率; 高通量平衡透析; 基质效应; 透析液; 人参皂苷 R_{g1}

[中图分类号] R945; R969.1; R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)18-0071-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017180071

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170626.1624.008.html>

[网络出版时间] 2017-06-26 16:24

Investigation of Rat Plasma Protein Binding Characteristics of Anemoside B4 by High-throughput Equilibrium Dialysis Combined with UPLC-MS/MS Technique

JIA Jia¹, OUYANG Hui^{1,2}, HE Ming-yu¹, HE Ming-zhen^{1,2*}, QIU Jia-ming^{3*},
FENG Yu-lin^{1,2}, YANG Shi-lin^{1,2}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. State Key Laboratory of Innovative Drug and Efficient Energy-Saving Pharmaceutical Equipment, Nanchang 330006, China; 3. Yichun University, Yichun 336000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an analytical method for investigating the protein binding rate of anemoside B4 in rats plasma. **Method:** High-throughput equilibrium dialysis was employed to dialysis, an UPLC-MS/MS for determination of anemoside B4 both in the inner and outer dialysate was established and then the protein-binding rate with rats plasma was calculated, Waters XTerra MS C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 5 μm) was employed with mobile phase of acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution for gradient elution. **Result:** The linearity of anemoside B4 was in the range of 5-2 000 ng·L⁻¹. The RSDs of precision, accuracy, repeatability and stability of anemoside B4 were all less than 15%, and its extraction recovery and matrix effect were in 80% -115%. The protein binding rates of anemoside B4 in high, middle and low concentrations (6, 12, 24 mg·L⁻¹) were (95.32 ± 0.37)%, (94.32 ± 0.63)% and (88.64 ± 0.37)%, respectively. **Conclusion:**

[收稿日期] 20170406(012)

[基金项目] 江西省 2016 年度研究生创新专项(YC2016-S359);江西省自然科学基金项目(S2016ZRMSB0827);江西省教育厅科学技术研究项目(150864);江西省卫生和计划生育委员会项目(2015B048)

[第一作者] 贾佳,在读硕士,从事中药活性成分与体内代谢研究,Tel:15797638156,E-mail:15797638156@163.com

[通讯作者] *何明珍,博士,讲师,从事中药活性成分与体内代谢研究,Tel:0791-87119633,E-mail:hmz07@163.com;

*邱家明,硕士,副教授,从事中药新药及药事管理研究,Tel:0795-3201926,E-mail:1178747620@qq.com

Anemoside B4 has a higher binding intension with plasma protein, which has on concentration-dependent manner.

[Key words] Pulsatillae Radix; anemoside B4; plasma protein binding rate; high-throughput equilibrium dialysis; matrix effect; dialysate; ginsenoside Rg₁

白头翁为毛茛科植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* 的干燥根,具有凉血止痢、清热解毒之功效^[1]。现代药理研究表明白头翁具有抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗氧化等药理作用^[2]。白头翁皂苷 B4 为五环三萜皂苷类化合物,为白头翁的有效成分之一,课题组前期药理与药效实验研究表明其具有较好的抗炎活性,具有进一步开发成中药抗炎一类新药的潜力。

血浆蛋白结合率不仅对药物在体内的吸收、分布、代谢、排泄过程均有影响,而且与药物的药理作用强度密切相关,有利于指导药物的给药方案设计和安全性评价,对于活性成分成药性研究具有重要意义^[3-4]。因此,为了更好地了解药物浓度与药理作用两者之间的关系,必须要确定未与血浆蛋白结合的总药物浓度^[5]。目前测定皂苷类血浆蛋白结合率的方法主要有平衡透析法和超滤法,经典的平衡透析法需要较长的时间达到平衡,这样会导致血浆蛋白稀释;超滤法易产生非特异性结合药物,且在离心过程中超滤液中会有少量蛋白残留^[6-7]。而高通量平衡透析法(HT-ED)的优点在于与血浆蛋白药物结合分析时处于平衡状态,从而消除可能产生的非特异性结合,解决了经典平衡透析法耗时、繁琐、只能测定单一化合物的缺点。UPLC-MS/MS 分析技术具有快速、高效和灵敏度高等优点,能准确地测定微量药物在生物基质中的含量^[8-9]。本实验采用 HT-ED 结合 UPLC-MS/MS 分析技术研究白头翁皂苷 B4 在大鼠血浆中的血浆蛋白结合率,为其后续的研究与开发提供理论依据。

1 材料

QTRAP 4500 型超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱(UPLC-MS/MS,美国 AB SCIEX 公司),BT25S 型 1/10 万电子分析天平(德国赛多利斯公司),HC-3018R 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司),VORTEX3 型旋涡混匀器(德国 IKA 公司),Milli-Q 型超纯水处理系统(美国密理博公司),96 通道高通量平衡透析系统(HTD 96b,美国 HTDialysis 公司)。

白头翁皂苷 B4(自制,通过核磁氢谱、碳谱和质谱鉴定为白头翁皂苷 B4,经 HPLC-UV 和 HPLC-ELSD 峰面积归一法测定,纯度 >98%),人参皂苷 Rg₁ 对照品(云南植物药业有限公司,批号

20060903,纯度 >98%),SD 大鼠空白血浆(北京索莱宝科技有限公司,批号 20171223),水为超纯水,甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 空白透析液 精密称取磷酸二氢钾 1.91 g,磷酸氢二钾 13.89 g,乙二胺四乙酸(EDTA) 37.24 mg,置于 1 L 量瓶中,加适量水溶解并定容至 1 L,即得 pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)。

2.1.2 内标溶液 称取人参皂苷 Rg₁ 对照品约 12 mg,精密称定,置于 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,得质量浓度约 0.12 g·L⁻¹ 的人参皂苷 Rg₁ 储备液;取该储备液适量,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至质量浓度约 7.5 mg·L⁻¹,4 ℃ 冰箱冷藏,备用。

2.1.3 样品溶液 取白头翁皂苷 B4 约 30 mg,精密称定,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,配制质量浓度约 1.20 g·L⁻¹ 的白头翁皂苷 B4 储备液;取该储备液适量,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释成 8 个系列质量浓度工作液,4 ℃ 冰箱冷藏,备用。

2.2 检测条件 采用 Waters XTerra MS C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 5 μm),流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 1.5 min, 10% ~ 50% B; 1.5 ~ 2.0 min, 50% ~ 95% B; 2.0 ~ 2.5 min, 95% B; 2.5 ~ 3.0 min, 95% ~ 10% B; 3.0 ~ 4.0 min, 10% B),流速 0.7 mL·min⁻¹,柱温 40 ℃,进样量 5 μL。离子源为电喷雾电离源(ESI),负离子模式,多反应监测(MRM),喷雾电压 -4.5 kV,离子化温度(TEM) 650 ℃,雾化气(GS1)和辅助气(GS2)压力均为 0.345 MPa,气帘气压力(CUR) 0.172 MPa,白头翁皂苷 B4 和人参皂苷 Rg₁ 的去簇电压(DP)分别设定为 -218, -171 V,碰撞电压(CE)分别为 -70, -35 eV,白头翁皂苷 B4 和内标的质荷比分别为 m/z 1 219.0 ~ 749.2 和 m/z 799.3 ~ 637.3。

2.3 样品的预处理

2.3.1 透析内液 取透析内液 50 μL,置于 1.5 mL 离心管中,加入 7.5 mg·L⁻¹ 人参皂苷 Rg₁ 内标溶液 20 μL 和甲醇 230 μL,涡旋(2 000 r·min⁻¹, 3 min, 下同),离心(16 000 r·min⁻¹, 10 min, 下同),取上清

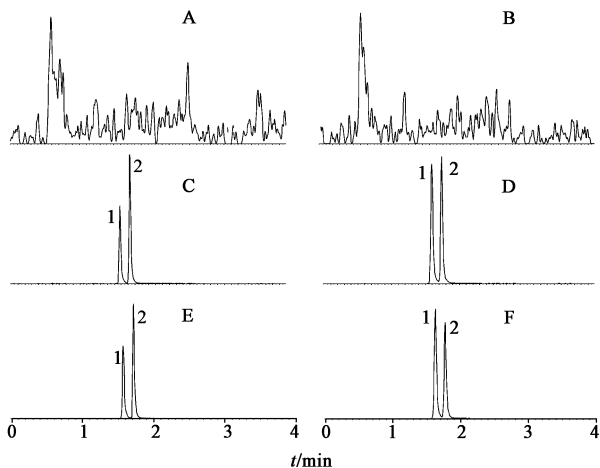
液 5 μL 进样。

2.3.2 透析外液 取透析外液 50 μL , 置于 1.5 mL 离心管中, 加入 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 人参皂苷 Rg_1 内标溶液 20 μL 和甲醇 230 μL , 涡旋, 室温下氮气吹干, 加甲醇 300 μL 复溶, 涡旋, 离心, 取上清液 5 μL 进样。

2.4 平衡透析试验 分别取 $0.12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 白头翁皂苷 B4 溶液 150, 100, 50 μL , 用空白大鼠血浆进行稀释, 配制成 6, 12, 24 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血浆样品 ($n = 3$)^[10]。在上 HTD 96b 装置之前, 透析膜用水浸泡 1 h, 用 20% 乙醇浸泡 20 min, 用水洗涤 2 次。平衡试验在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴摇床中进行, 透析装置用胶黏密封, 以防止挥发和 pH 的改变。于超滤板的小孔一侧加入血浆样品 150 μL , 于另一侧加入 PBS (pH 7.4) 150 μL , 将超滤装置置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴摇床。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性试验 分别取空白血浆、空白血浆 + 对照品、血浆样品、空白透析液、透析液 + 对照品及透析外液, 按 2.3 项下方法处理, 按 2.2 项下条件测定。在此条件下, 白头翁皂苷 B4 和人参皂苷 Rg_1 的保留时间分别约为 1.75, 1.60 min, 未发现其他物质对检测产生干扰, 见图 1。



A. 空白血浆; B. 空白透析液; C. 空白血浆 + 对照品; D. 透析液 + 对照品; E. 血浆样品; F. 透析外液; 1. 人参皂苷 Rg_1 (内标); 2. 白头翁皂苷 B4

图 1 白头翁皂苷 B4 及内标的 UPLC

Fig. 1 UPLC chromatograms of anemoside B4 and its internal standard

2.5.2 线性关系考察 取 8 个质量浓度的白头翁皂苷 B4 工作液各 20 μL , 依次加入空白血浆或空白透析液 50 μL , 人参皂苷 Rg_1 工作液 20 μL 和甲醇 210 μL , 按 2.3 项下方法处理, 按 2.2 项下条件测定。以白头翁皂苷 B4 峰面积与内标峰面积比值为

纵坐标, 血药浓度为横坐标, 得透析内液、透析外液回归方程分别为 $Y = 0.0209X + 0.0357$ ($r = 0.9982$), $Y = 0.0183X + 0.0145$ ($r = 0.9992$), 线性范围 5 ~ 2000 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[10]。超过标准曲线范围的可以稀释 10 倍后进行测定, 可测定的最高质量浓度为 20 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5.3 精密度和准确度 按 2.5.2 项下方法将白头翁皂苷 B4 用空白血浆和空白透析液配制成低、中、高 (10, 500, 1600 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 质量浓度的样品溶液, 每个浓度样品平行 3 份, 按 2.3 项下方法处理, 按 2.2 项下条件测定, 计算白头翁皂苷 B4 在血浆样品及 PBS 中的日内、日间精密密度 RSD 及准确度均 $< 8.0\%$ 。

2.5.4 提取回收率和基质效应 制备 2.5.3 项下低、中、高质量浓度的透析内、外液样品, 每个质量浓度样品平行 3 份; 另取空白大鼠血浆处理后, 制备 3 个相同质量浓度白头翁皂苷 B4 的透析内液样品, 每个浓度样品平行 3 份; 制备 3 个相同质量浓度白头翁皂苷 B4 空白溶液, 每个浓度样品平行 3 份。按 2.3 项下方法处理, 按 2.2 项下条件测定, 利用白头翁皂苷 B4 的峰面积计算提取回收率和基质效应, 结果 3 个质量浓度样品的提取回收率分别为 $(89.88 \pm 0.79)\%$, $(106.98 \pm 3.47)\%$, $(112.50 \pm 5.97)\%$; 3 个质量浓度样品的基质效应分别为 $(85.86 \pm 1.53)\%$, $(98.49 \pm 6.92)\%$, $(85.69 \pm 6.98)\%$ 。

2.5.5 重复性试验 制备 2.5.3 项下低、中、高 3 个质量浓度的透析内、外液样品, 每个浓度样品平行 6 份, 按 2.3 项下方法处理, 按 2.2 项下条件测定, 计算 3 个质量浓度样品的重复性 RSD 均 $< 9.0\%$ 。

2.5.6 稳定性试验 制备 2.5.3 项下低、中、高 3 个质量浓度的透析内、外液样品, 每个浓度样品平行 3 份, 按 2.3 项下方法处理, 按 2.2 项下条件测定, 考察血浆样品处理后在进样装置中放置 12 h, 置于 -40°C 冰箱中 3 次冻融循环, 0°C 冰箱中放置 3 d 的稳定性以及 PBS 样品处理后在进样装置中放置 12 h, 0°C 冰箱中放置 3 d 的稳定性。结果显示 3 个质量浓度的白头翁皂苷 B4 在各种条件下与内标峰面积比值的 RSD 均 $< 15\%$, 表明血浆样品在上述条件下均稳定。

2.6 平衡时间考察 取 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 白头翁皂苷 B4 溶液, 按 2.4 项下方法进行平衡透析试验, 分别孵育 2, 4, 6 h 后取样分析, 按 2.3 项下方法处理, 按 2.2 项下条件测定, 计算白头翁皂苷 B4 的血浆蛋白结

合率分别为 $(81.38 \pm 0.32)\%$, $(94.32 \pm 0.63)\%$ 和 $(95.33 \pm 0.34)\%$ 。利用 SPSS 21.0 统计软件进行 *t* 检验,结果显示 4 h 的血浆蛋白结合率明显高于 2 h 的血浆蛋白结合率,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);4 h 的血浆蛋白结合率与 6 h 的血浆蛋白结合率相当,差异无统计学意义,表明白头翁皂苷 B4 透析 4 h 后已达平衡。

2.7 血浆蛋白结合率的计算 按血浆蛋白结合率 = $[(\text{白头翁皂苷 B4})_{\text{血浆}} - (\text{白头翁皂苷 B4})_{\text{PBS}}] / (\text{白头翁皂苷 B4})_{\text{血浆}} \times 100\%$ 计算白头翁皂苷 B4 的血浆蛋白结合率,见表 1。

表 1 不同质量浓度白头翁皂苷 B4 的血浆蛋白结合率

Table 1 Plasma protein binding rates of anemoside B4 with different concentration

白头翁皂苷 B4 质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	血浆蛋白结合率/%			
	1	2	3	平均值($\bar{x} \pm s$)
6	94.90	95.60	95.48	95.32 ± 0.37
12	93.60	94.72	94.64	94.32 ± 0.63
24	88.98	88.69	88.25	88.64 ± 0.37

3 讨论

经典平衡透析法处理样品能力有限,由于透析膜表面具有非特异性吸附可能会使活性位点被非特异性蛋白占据,而且此法需要较多的血浆样品^[11-12]。本文建立了 HT-ED 联合 UPLC-MS/MS 分析技术研究白头翁皂苷 B4 在大鼠血浆中的血浆蛋白结合率,HT-ED 是一种利用 HTD 96b 装置进行平衡透析的方法,其聚四氟乙烯材料在平衡透析时可防止非特异性吸附药物,而 UPLC-MS/MS 分析技术的具有快速、灵敏、高效的特点^[5]。以上 2 种方法的结合可准确、快速地分析药物的血浆蛋白结合率。

通过对高、中、低质量浓度白头翁皂苷 B4 与大鼠血浆蛋白结合率的研究发现,白头翁皂苷 B4 的血浆蛋白结合率较强,与其他研究成果类似^[13]。本文通过研究发现,该药血浆蛋白结合率随着质量浓度的升高而降低,此结果可为白头翁皂苷 B4 的药物代谢动力学及药理药效研究提供数据支持。当 2 种药物联合应用时,某些药物能在血浆蛋白结合部位上发生竞争排挤现象。这种相互作用会使某些药物从结合部位上置换下来,药物的体内暴露量提高,可能导致潜在的安全性风险增加,建议选择临床上有可能合并使用的药物,开展体外药物竞争结合试验,考察其对血浆蛋白结合率的影响^[14-16]。

[参考文献]

[1] 陈振华,管咏梅,杨世林,等.白头翁研究进展[J].中成药,2014,36(11):2380-2383.

[2] 牛盼盼,王颖,李露,等.白头翁汤的化学成分及药理活性研究概况[J].医药卫生:文摘版,2016(8):192-193.

[3] 饶小勇,尹姗,张尧,等.白头翁皂苷 D 与不同血浆蛋白的结合率测定[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(8):114-117.

[4] Otagiri M. Study on binding of drug to serum protein [J]. Yakugaku Zasshi, 2009, 129(4):413-425.

[5] Banker M J, Clark T H, Williams J A. Development and validation of a 96-well equilibrium dialysis apparatus for measuring plasma protein binding [J]. J Pharm Sci, 2003, 92(5):967-974.

[6] Waters N J, Jones R, Williams G, et al. Validation of a rapid equilibrium dialysis approach for the measurement of plasma protein binding [J]. J Pharm Sci, 2008, 97(10):4586-4595.

[7] WAN H, Rehgren M. High-throughput screening of protein binding by equilibrium dialysis combined with liquid chromatography and mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2006, 1102(1/2):125-134.

[8] Kariv I, CAO H, Oldenburg K. Development of a high throughput equilibrium dialysis method [J]. J Pharm Sci, 2001, 90(5):580-587.

[9] 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(2):187-194.

[10] HE M, OUYANG H, HE M, et al. Application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to the pharmacokinetics, tissue distribution and excretion in the study of anemoside B4, a novel antiviral agent candidate, in rats: Pharmacokinetics and tissue distribution of B4 [J]. Biomed Chromatogra, 2016, doi: 10.1002/bmc.3914.

[11] Vanstraelen K, Wauters J, De L H, et al. Protein-binding characteristics of voriconazole determined by high-throughput equilibrium dialysis [J]. J Pharm Sci, 2014, 103(8):2565-2570.

[12] Zamek-Gliszczyński M J, Ruterbories K J, Ajamie R T, et al. Validation of 96-well equilibrium dialysis with non-radiolabeled drug for definitive measurement of protein binding and application to clinical development of highly-bound drugs [J]. J Pharm Sci, 2011, 100(6):2498-2507.

[13] 吴秀君,崔向勇,高峰,等.七叶皂苷 A 的大鼠血浆蛋白结合率研究[J].中国临床药理学杂志,2015,31(5):358-361.

[14] 吴阳,张英丰.超滤法测定脱水穿心莲内酯的血浆蛋白结合率[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(21):57-59.

[15] 曹伟,陈彦,袁菱,等.华蟾酥毒基和酯蟾毒配基与不同血浆蛋白结合率的测定[J].药学报,2012,47(9):1200-1204.

[16] 张二锋,赵军利,杨静,等.超滤法和 HPLC 法测定 14-去氧穿心莲内酯的血浆蛋白结合率[J].中成药,2016,38(3):689-691.

[责任编辑 刘德文]