

白头翁皂苷D与不同血浆蛋白的结合率测定

饶小勇^{1,2}, 尹姗³, 张尧², 罗晓健^{2,3}, 龚明³, 冯育林^{2,3}, 杨世林^{1,2*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102;

2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006; 3. 江西中医学院, 南昌 330006)

[摘要] 目的: 研究白头翁皂苷D与不同血浆蛋白的结合率。方法: 采用HPLC与平衡透析法相结合的方法测定白头翁皂苷D与牛血清、人血浆及大鼠血浆中蛋白的结合率, COSMOSIL 5C₁₈-MS-II色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水-甲酸(80:20:0.02), 检测波长203 nm。结果: 白头翁皂苷D质量浓度为0.06, 0.11, 0.25 g·L⁻¹时与牛血清白蛋白的结合率分别为(78.45 ± 0.89)%, (77.61 ± 1.14)%, (77.16 ± 0.29)%, 与人血浆蛋白的结合率分别为(68.91 ± 0.54)%, (67.68 ± 0.87)%, (67.88 ± 0.71)%, 与大鼠血浆蛋白的结合率分别为(78.15 ± 0.76)%, (78.61 ± 0.97)%, (78.24 ± 0.93)%。结论: 建立的白头翁皂苷D蛋白结合率测定方法简便、稳定、可靠。白头翁皂苷D是一种中等程度的蛋白结合药物, 结合率不具有质量浓度依赖性。

[关键词] 白头翁皂苷D; 蛋白结合率; 高效液相色谱法; 平衡透析法

[中图分类号] R283.6; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)08-0114-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014080114

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000029.html>

[网络出版时间] 2014-02-07 15:14

Determination of Plasma Protein Binding Rate of Pulsatilla Saponin D in Several Species

RAO Xiao-yong^{1,2}, YIN Shan³, ZHANG Yao², LUO Xiao-jian^{2,3},
GONG Ming³, FENG Yu-lin^{2,3}, YANG Shi-lin^{1,2*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China; 3. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate different plasma protein binding rates of pulsatilla saponin D. **Method:** HPLC and equilibrium dialysis method were adopted to determine plasma protein binding rates of pulsatilla saponin D in bovine serum, human and rat plasma, COSMOSIL 5C₁₈-MS-II column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was employed with mobile phase of methanol-water-formic acid (80:20:0.02) and detection wavelength at 203 nm. **Result:** Plasma protein binding rates of pulsatilla saponin D at three various concentrations (0.06, 0.11, 0.25 g·L⁻¹) were (78.45 ± 0.89)%, (77.61 ± 1.14)%, (77.16 ± 0.29)% in bovine serum albumin, they were (68.91 ± 0.54)%, (67.68 ± 0.87)%, (67.88 ± 0.71)% in human plasma and (78.15 ± 0.76)%, (78.61 ± 0.97)%, (78.24 ± 0.93)% in rat plasma, respectively. **Conclusion:** This method for determining plasma protein binding rates of pulsatilla saponin D was simple, stable and reliable. Pulsatilla saponin D was a drug with moderate plasma protein binding rate, which did not have concentration-dependent manner.

[Key words] pulsatilla saponin D; protein binding rate; HPLC; equilibrium dialysis method

[收稿日期] 20130921(013)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX11102-001-19); 江西省自然科学基金项目(20114BAB215045); 江西省优势科技创新团队计划项目(2010DQB01700); 江西省教育厅产学研合作项目(GJJ11006)

[第一作者] 饶小勇, 在读博士, 从事天然药物活性成分研究, Tel:18907086080, E-mail: rxy1014@163.com

[通讯作者] * 杨世林, 博士生导师, 教授, Tel:0791-87119638, E-mail: slyang3636@126.com

白头翁皂苷 D(PSD)是从白头翁中分离得到的一种常春藤皂苷,具有较强抗肿瘤活性^[1-3],可作为抗肿瘤候选新药。药物血浆蛋白结合率是临床前药动学的重要参数之一,会影响药物在体内的分布、排泄和代谢速率,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^[4],但目前尚无 PSD 与蛋白结合的相关报道。本实验采用 HPLC 和经典平衡透析法测定 PSD 与人血浆、牛血清白蛋白及大鼠血浆中蛋白的结合规律,完善 PSD 药物动力学参数,为探讨 PSD 的作用机制及临床应用提供参考。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),BS2202S 型 1/万电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),Synergy 型超纯水系统(美国密理博公司),TDL-40B 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂),TG16-WS 型台式高速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司),HH-2 型数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司)。

人血浆白蛋白(HSA,美国 Sigma 公司),牛血清白蛋白(BSA,Roche 公司),透析袋(上海晨易生物科技,截留相对分子质量 2 000),白头翁皂苷 D 对照品(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,经 DAD 检测器面积归一法计算纯度 99.6%),白头翁皂苷 D 提取物(自制,纯度 >90%),甲醇为色谱纯,水为自制蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

健康 SD 大鼠,雌性,体重(220 ± 20) g,购自湖南斯莱克信达实验动物有限公司,合格证号 SCXK(湘)2011-0003。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 空白透析液 精密称取磷酸氢二钾 14.110 g,磷酸二氢钾 2.592 g,氯化钠 1.991 g,置于 1 L 量瓶中,加水溶解并稀释到刻度,制成 pH 7.4 缓冲液,即得。

2.1.2 对照品溶液 精密称取白头翁皂苷 D 对照品约 25 mg,置于 50 mL 量瓶中,加空白透析液超声溶解并定容至刻度,摇匀,得 0.513 g·L⁻¹ 对照品溶液。

2.1.3 BSA 溶液 精密称取 BSA 适量,加水溶解并配制 1 mol·L⁻¹ 的溶液,于 4 °C 保存备用。

2.1.4 HSA 溶液 精密称取 HSA 适量,加水溶解并配制 40 g·L⁻¹ 的溶液,于 4 °C 保存备用。

2.1.5 大鼠血浆溶液 取 SD 大鼠 4 只(雌雄各

半),麻醉,从锁骨下动脉采血,血液用采血管收集,于 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,得大鼠血浆,于 -60 °C 保存备用。

2.1.6 含药透析外液 精密称取白头翁皂苷 D 提取物约 75 mg,置于 150 mL 量瓶中,加空白透析液超声溶解并定容,摇匀,配制质量浓度约 0.5 g·L⁻¹ 储备液;取储备液分别加空白透析液稀释成质量浓度为 0.25,0.125 g·L⁻¹ 的透析外液。

2.1.7 透析液样品 精密量取血浆样品(透析袋内液)或透析外液样品 0.2 mL,加甲醇 1 mL,涡旋 2 min 混匀,10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,即得。

2.2 透析样品分析方法

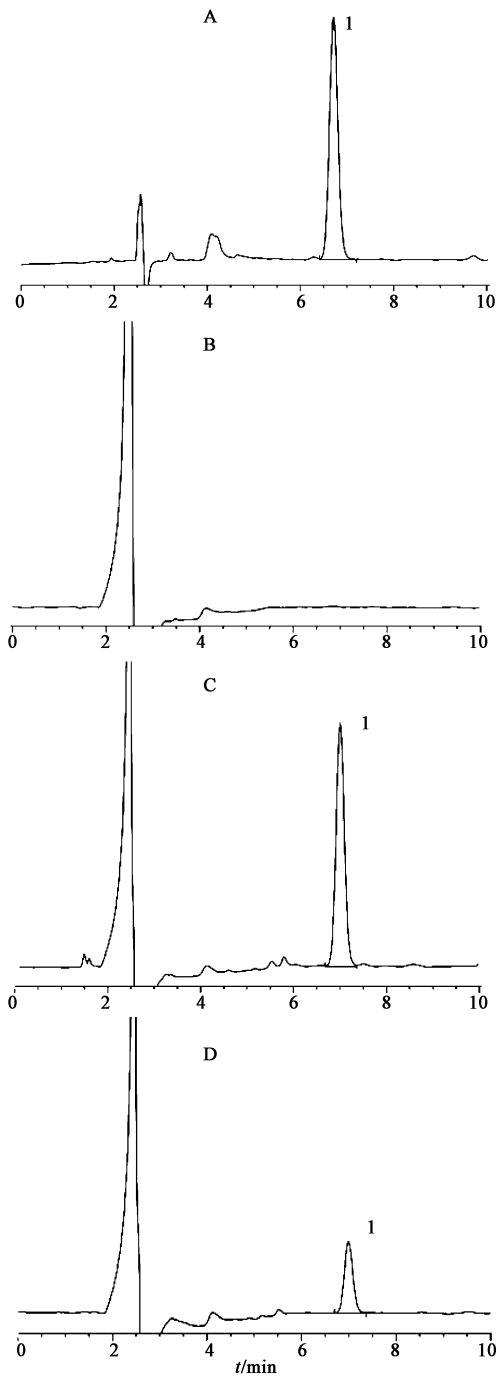
2.2.1 色谱条件 COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相甲醇-水-甲酸(80:20:0.02),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL,见图 1,说明白头翁皂苷 D 分离度良好且阴性样品无干扰。

2.2.2 标准曲线的制备 精密量取适量白头翁皂苷 D 对照品溶液(1.026 g·L⁻¹),加甲醇稀释成质量浓度分别为 0.051 3,0.205 2,0.307 8,0.513 0,0.769 5 g·L⁻¹ 的对照品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,对照品质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 3\,055.8X + 26.21$ ($r = 0.999\,9$),线性范围 0.051 3 ~ 1.026 g·L⁻¹。

2.2.3 精密度试验 精密吸取 BSA 空白血浆(透析袋内液)或空白透析液(透析外液),加入白头翁皂苷 D 提取物储备液,分别制成高(0.25 g·L⁻¹)、中(0.10 g·L⁻¹)、低(0.05 g·L⁻¹)质量浓度的样品,按 2.1.7 项下方法处理,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算透析袋内液日内精密度分别为 1.11%,1.32%,1.56%,日间精密度分别 2.85%,2.21%,1.72%;透析外液日内精密度分别为 1.46%,2.24%,1.52%,日间精密度分别 2.08%,1.73%,1.78%,表明该方法精密度良好。

2.2.4 稳定性试验 取已知含量的含药透析袋内液样品,按 2.1.7 项下方法处理,分别在 0,2,6,12,24 h 按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算峰面积的 RSD 2.05%,表明含药血浆样品在 24 h 内保持稳定。

2.2.5 回收率试验 精密吸取 BSA 空白血浆,加入白头翁皂苷 D 提取物储备液,分别制成高、中、低质量浓度(0.21,0.10,0.05 g·L⁻¹)的样品,按 2.1.7 项下方法处理,按 2.2.1 项下色谱条件测定;另取相同质量浓度的对照品溶液按 2.2.1 项下色谱条件测



A. 对照品; B. 空白透析液; C. 含药透析袋内液;
D. 含药透析外液; 1. 白头翁皂苷 D
图 1 白头翁皂苷 D 提取物 HPLC

定, 计算回收率依次为 97.56%, 91.41%, 94.68%, RSD 分别为 1.97%, 0.61%, 3.71%。

2.3 血浆蛋白结合率的测定 采用平衡透析法测定。取处理后的透析袋(长度约 10 cm)一端用透析夹夹住, 取血浆 3 mL 加入透析袋中, 使透析袋中留有少量空气, 并将透析袋的另一端用透析夹夹紧, 放

于盛有约 110 mL 含药透析液自制圆筒中, 测定 3 个不同质量浓度, 每个质量浓度平行 3 次试验, 调整透析袋内外液面使其保持同一水平, 并使透析袋不靠筒壁, 以免影响药物的透析, 置于 37 °C 水浴搅拌, 透析至平衡后, 用三氯乙酸试剂检查袋外透析液有无蛋白质漏出。取透析平衡后的袋内血浆和袋外透析液按 2.1.7 项下方法处理, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 计算袋内血药浓度 ($C_{内}$) 及袋外药物浓度 ($C_{外}$), 推算血浆蛋白结合率。

$$\text{血浆蛋白结合率} = (C_{内} - C_{外}) / C_{内} \times 100\%$$

2.3.1 平衡透析时间考察 取 0.2 g·L⁻¹ 白头翁皂苷 D 放于自制透析圆筒中, 共 15 份, 每份 50 mL, 分成 5 组, 于 1, 4, 8, 12, 24 h 取样, 按 2.1.7 项下方法处理, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 计算药物血浆蛋白结合率分别为 (9.99 ± 0.65)%, (57.66 ± 0.77)%, (73.27 ± 1.68)%, (78.08 ± 1.31)%, (79.22 ± 2.05)%, 采用 SPSS 统计软件进行方差分析, P 值检验发现 12 h 与 1, 4, 8 h 存在显著差异性 ($P < 0.05$), 而与 24 h 则无显著性差异性, 说明 12 h 时透析已达平衡。

2.3.2 白头翁皂苷 D 与不同血浆蛋白结合率的测定 取 3 种质量浓度 (0.06, 0.11, 0.25 g·L⁻¹) 含药透析外液, 分别对牛血清白蛋白、人血浆蛋白及大鼠血浆蛋白 (RP) 的结合率进行考察, 结果见表 1, 表明白头翁皂苷 D 与不同属血浆蛋白结合率存在一定差异性。

表 1 白头翁皂苷 D 与血浆蛋白结合率的测定 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

白头翁皂苷 D 质量浓度/g·L ⁻¹	BSA 结合率 /%	HSA 结合率 /%	RP 结合率 /%
0.06	78.45 ± 0.89	68.91 ± 0.54	78.15 ± 0.76
0.11	77.61 ± 1.14	67.68 ± 0.87	78.61 ± 0.97
0.25	77.16 ± 0.29	67.88 ± 0.71	78.24 ± 0.93

3 讨论

药物与血浆蛋白结合率的测定方法包括平衡透析法、超滤法、超速离心法、凝胶色谱方法和白蛋白微球测定法等^[5-6], 其中平衡透析法操作简单、所需设备简单、测定结果稳定, 故本文采用平衡透析法测定白头翁皂苷 D 与不同属血浆蛋白的结合率。预试验对平衡透析影响因素(平衡温度、平衡时间、泄漏)进行考察, 平衡温度考察了 37, 4 °C, 发现 4 °C 平衡时间需 80 h, 而 37 °C 只需 12 h, 试验过程中采用三氯乙酸试剂监控血浆是否有泄漏, 以保证试验结果的稳定。

试验结果表明不同血浆空白样品不会干扰白头翁皂苷 D 的测定。通过对流动相及不同扫尾剂进行考察,发现采用流动相甲醇-水-甲酸(80:20:0.02)可有效改善白头翁皂苷 D 的拖尾问题,所得峰形和分离度均较好。同时对透析内外液样品处理方法进行考察,确定宜采用甲醇蛋白沉淀法,透析样品与甲醇比例为 1:5 时可保证样品的回收率符合要求。

白头翁皂苷 D 与不同血浆蛋白结合存在较大差异性,与 BSA,RP 的蛋白结合率大于 HAS。采用 SPSS 软件进行方差分析,结果表明 HAS 结合率与 BSA,RP 结合率存在显著差异性,而 BSA,RP 的结合率不存在显著差异性;通过对高、中、低质量浓度白头翁皂苷 D 与不同属血浆蛋白结合率数据发现,白头翁皂苷 D 的血浆蛋白结合率不存在质量浓度依赖性。白头翁皂苷 D 与 HSA 的蛋白结合率近 70%,因白头翁皂苷 D 属于皂苷类成分易产生溶血作用,提示后续临床应用过程中需考虑与其他高蛋白结合率药物是否存在竞争性结合试验。

[参考文献]

- [1] Kang S S. Saponins from the roots of *Pulsatilla koreana* [J]. Arch Pharm Res,1989,12(1):42.
- [2] Mimaki Y, Kuroda M, Asano T, et al. Triterpene saponins and lignans from the roots of *Pulsatilla chinensis* and their cytotoxic activity against HL-60 cells [J]. J Nat Prod, 1999, 62(9):1279.
- [3] Kim Y, Bang S C, Lee J H, et al. *Pulsatilla* saponin D; the antitumor principle from *Pulsatilla koreana* [J]. Arch Pharm Res, 2004, 27(9):915.
- [4] 姚志红,曹秀珍,邵萌,等.超滤法测定甲基原薯蓣皂苷的血浆蛋白结合率[J].中国中药杂志,2008,33(11):1291.
- [5] 王长虹,王峥涛.超滤法测定龙胆苦苷的血浆蛋白结合率[J].中国药学杂志,2005,40(3):232.
- [6] 陈锐,朱玲,张海霞.几种测定芒果苷与牛血清白蛋白结合率方法的比较研究[J].兰州医学院学报,2011,37(1):55.

[责任编辑 全燕]

《中国当代医药》杂志 欢迎投稿 欢迎订阅

《中国当代医药》杂志是国家卫生和计划生育委员会主管,中国保健协会、当代创新(北京)-医药科学研究院主办的医药卫生专业期刊,本刊已被万方数据数字化期刊群、中国核心期刊(遴选)数据库、中国知网、中国学术期刊网络出版总库、中文科技期刊全文数据库全文收录,系中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊。现为旬刊,国内刊号:CN11-5786/R,国际刊号:ISSN 1674-4721,邮发代号:2-515,定价:每期 20 元,通过本刊发行部订阅全年 36 期杂志优惠价为 540 元。

主要栏目:研究进展、论著、短篇论著、临床研究、药理与毒理、药品鉴定、药物与临床、麻醉与镇痛、医学检验、影像与介入、中医中药、护理研究、工作探讨、医护论坛等 50 多个栏目。根据全国继续医学教育委员会的《继续医学教育学分授予与管理办法》学分授予标准,在本刊发表的论文可获得国家级继续教育学分。本刊出版周期短,来稿无论录用与否均在短期内告知作者。对省、部级以上部门立项的科研论文以及本刊订户的论文予以优先刊登。本刊订户凭订户单复印件投稿,同等条件优先录用。欢迎各医药单位、院校、厂家刊登广告。

社址:北京市朝阳区通惠家园惠润园(壹线国际)5-3-602 邮编:100025

投稿热线:010-59679076 59679077 发行热线:010-59679533 传真:010-59679056

投稿邮箱:ddy@vip.163.com 网址:www.dangdaiyiyao.com(网站改版中)