

超滤法测定脱水穿心莲内酯的血浆蛋白结合率

吴阳,张英丰*

(广州中医药大学,广州 510006)

[摘要] 目的:建立血浆中脱水穿心莲内酯的分析方法,测定脱水穿心莲内酯血浆蛋白结合率。方法:采用超滤法和高效液相色谱法测定脱水穿心莲内酯在 BSA、正常人血浆、大鼠血浆中的蛋白结合率。结果:脱水穿心莲内酯与 BSA、正常人血浆、大鼠血浆中的蛋白结合率分别为 $(71.50 \pm 1.50)\%$ 、 $(79.91 \pm 2.51)\%$ 、 $(82.41 \pm 2.05)\%$ 。结论:脱水穿心莲内酯与血浆具有中等强度结合。

[关键词] 脱水穿心莲内酯;血浆蛋白结合率;超滤法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)21-0057-03

Protein Binding Percentage of Dehydroandrographolide in Different Plasma Samples by Ultrafiltration

WU Yang, ZHANG Ying-feng*

(Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study protein binding percentage of dehydroandrographolide in different plasma samples. **Method:** The protein binding rates of dehydroandrographolide in BSA plasma samples, human plasma samples and rat plasma samples were determined by ultrafiltration and HPLC. **Result:** The plasma protein binding rate of dehydroandrographolide with BSA, human plasma, rat plasma were $(71.50 \pm 1.50)\%$, $(79.91 \pm 2.51)\%$, $(82.41 \pm 2.05)\%$ respectively. **Conclusion:** The binding of dehydroandrographolide with plasma is middle degree.

[Key words] dehydroandrographolide; plasma protein binding percentage; ultrafiltration

穿心莲为爵床科植物穿心莲 *Andrographis paniculara* (Burm. f) Nees 的地上部分,具有解热、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗菌等作用。常用于感冒发热,咽喉肿痛,口舌生疮,热淋涩痛,臃肿疮疡等,脱水穿心莲内酯为其主要有效成分^[1]。药物与血浆蛋白结合率是药物代谢动力学的重要参数之一,与药物在体内的分布、代谢、排泄等密切相关,对新药研发及指导临床用药均具有重要意义^[2]。本研究采用超滤

法测定了脱水穿心莲内酯的血浆蛋白结合率,为其进一步研究提供依据。

1 材料

1.1 仪器 Waters 高效液相色谱仪(515 泵,2487 紫外检测器,浙江大学 N3000 色谱工作站),精密移液器(美国 Synthesis 公司),AUW120D 1/10 万分析天平(日本岛津),XW-80A 微型涡旋混合仪(上海市沪西分析仪器厂有限公司),TG1650-WS 高速离心机(上海卢湘仪),超滤管(Millopore 公司,醋酸纤维素膜,相对分子质量截留值 10KD)。

1.2 试药 脱水穿心莲内酯对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110854-200306);BSA(美国 Sigma 公司,生化试剂);正常人血浆(健康志愿者);甲醇(天津科密欧化学试剂开发中心,色谱纯);水为纯化水,其他试剂为分析纯。

[收稿日期] 20110423(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30701097);广东省自然科学基金项目(9151052005000003)

[第一作者] 吴阳,硕士,研究方向:药物新剂型与新技术

[通讯作者] *张英丰,副教授,研究方向:生物药剂学与药物动力学,Tel:020-39358043

1.3 动物 SD 大鼠, 雄性, 体重 (200 ± 20) g, 由广州中医药大学动物实验中心提供(许可证号 SKXK 粤 2008-0020)。毛细管眼眦取血, $3\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离血浆, 置于 $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中冷冻备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromsil 100-5 C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相甲醇-水 (70:30), 流速 $1\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温室温, 检测波长 254 nm, 进样体积 10 μL 。

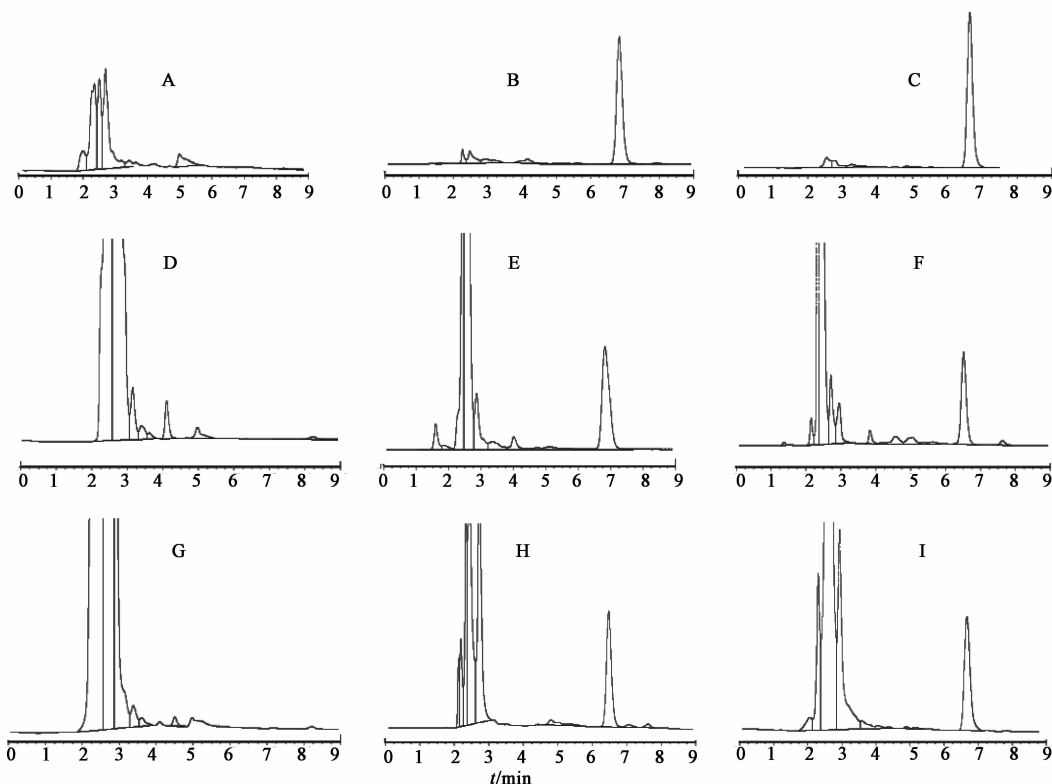
2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的配制 精密称取置五氧化二磷干燥器中干燥至恒重的脱水穿心莲内酯对照品 10 mg 于 10 mL 量瓶, 甲醇定溶得到浓度为 $1\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的脱水穿心莲内酯对照品储备液, 备用。

2.2.2 磷酸缓冲溶液的配制 取十二水磷酸氢二钠 19.028 g, 磷酸二氢钠 2.08 g, 氯化钠 4.4 g, 加水至 1 000 mL, 即得 pH 7.4 的等渗 PBS 溶液。

2.2.3 BSA 蛋白溶液的配制 称取 BSA 适量, 用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液溶解, 配制成 $40\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 溶液。

2.3 专属性考察 分别取 300 μL 大鼠空白血浆、BSA 溶液、人空白血浆置于超滤管超滤膜上, 置于离心机中 $10\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 分别对脱水穿心莲内酯对照品、空白血浆超滤液、空白血浆超滤液 + 对照品及样品进样 10 μL , 在所采用的色谱条件下, 脱水穿心莲内酯峰形良好, 无杂质干扰峰影响测定, 具有较高的专属性, 条件可行, 相关色谱见图 1。



A. 空白 BSA; B. BSA 空白血浆 + 对照品; C. BSA 超滤样品; D. 正常人空白血浆; E. 正常人空白血浆 + 对照品色谱图; F. 正常人血浆超滤样品色谱图; G. 大鼠空白血浆色谱图; H. 大鼠空白血浆 + 标准品色谱图; I. 大鼠血浆超滤样品色谱图

图 1 各样品色谱

2.4 标准曲线的制备 取脱水穿心莲内酯对照品储备液适量, PBS 倍比稀释, 得到为 100, 50, 10, 5, 2.5, 1, 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 系列脱水穿心莲内酯对照品溶液, 均进样 10 μL , 以峰面积 A 对浓度 C 做回归, 所得标准曲线 $A = 5E - 06 \times C - 0.031\ 9$ ($R^2 = 0.997\ 6$),

表明在 $0.5 \sim 100\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度与峰面积线性关系良好。

2.5 精密度考察 取 PBS 配制 50, 10, 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的高、中、低 3 个质量浓度的脱水穿心莲内酯对照品溶液, 1 d 内分别测定 5 次, 计算日内 RSD, 连续测定 5

d 计算日间 RSD。日内精密密度为 0.93%, 日间精密密度为 1.23%。

2.6 超滤膜回收率考察^[3] 取 PBS 配制浓度为 50, 10, 1 mg·L⁻¹ 的高、中、低 3 个浓度的脱水穿心莲内酯对照品溶液各 300 μL 置于超滤管超滤膜上, 置于离心机中 10 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取超滤液 10 μL 分析测定, 与对照品溶液峰面积对比计算回收率。超滤膜的回收率均 >95%, 表明脱水穿心莲内酯与超滤膜无特异性吸附。

2.7 血浆蛋白结合率实验^[4] 用移液枪分别吸取 PBS 配制 1 000, 250, 50 mg·L⁻¹ 脱水穿心莲内酯对照品溶液 0.5 mL, 至 9.5 mL 空白血浆中, 涡旋 1 min, 37 °C 水浴孵育 2 h, 取 300 μL 含药血浆, 置于超滤管超滤膜上, 置离心机中 10 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取超滤液 10 μL 分析测定, 每种浓度平行 5 份。结果见表 1。

表 1 脱水穿心莲内酯体外血浆蛋白结合率($\bar{x} \pm s, n=5$)

质量浓度 /μg·L	BSA /%	人血浆 /%	大鼠血浆 /%
5	72.18 ± 1.34	78.2 ± 3.52	81.54 ± 0.56
25	70.49 ± 2.18	79.36 ± 2.45	80.43 ± 3.04
100	71.84 ± 0.93	82.18 ± 1.57	85.25 ± 2.68
平均	71.50 ± 1.50	79.91 ± 2.51	82.41 ± 2.05

实验数据经 SPSS 软件进行方差分析, 结果表明, 高、中、低不同质量浓度的脱水穿心莲内酯血浆蛋白结合率之间差异无显著性, 穿心莲内酯与 BSA、正常人血浆、大鼠血浆的蛋白结合率之间差异存在显著性 ($P < 0.05$)。

3 讨论

透析法和超滤法为测定血浆蛋白结合率的经典方法。平衡透析法操作简单, 经济实惠, 但透析平衡时间较长, 且易受血浆和缓冲液 pH, Gibbs-Donnan 效应, 透析膜非特异性设备表面的吸附等因素的影响。超滤法减少了非特异性设备表面的吸附, 缩短

平衡时间, 加速了待测样品的溶解时间, 并且不受稀释效应和体积迁移的影响。

考察了药物的孵育温度及时间^[5]。分别在 4, 37 °C 进行孵育, 脱水穿心莲内酯与血浆之间的结合无明显差异, 经考察孵育 2 h, 脱水穿心莲内酯与蛋白达到结合平衡。超滤速度不宜过大, 一般为 3 000 ~ 10 000 r·min⁻¹, 超滤速度过大易导致超滤膜破损, 易导致样品泄漏, 影响测定结果。

脱水穿心莲内酯与 BSA、正常人血浆、大鼠血浆中的蛋白结合率分别为 (71.50 ± 1.50)%, (79.91 ± 2.51)%, (82.41 ± 2.05)%, 属于中等强度结合。并且脱水穿心莲内酯与药物的结合无浓度依赖性, 但不同种属血浆间存在差异, 可能与不同种属血浆中蛋白种类及结合位点不同有关, 或因脱水穿心莲内酯易受外界 pH 等因素影响^[6], 由于不同种属血浆 pH 环境不同导致差异明显, 有待进一步探讨。

[参考文献]

[1] 刘新建, 王一飞, 李贵生. 穿心莲内酯及其衍生物的药理研究进展[J]. 中药材, 2003, 26(2): 135.
 [2] 刘睿, 谢跃生, 潘桂湘, 等. 药物蛋白结合率测定方法的研究进展[J]. 天津中医药, 2007, 24(6): 526.
 [3] 刘敏彦, 赵韶华, 许红辉, 等. 朝藿定 C 在不同血浆中蛋白结合率的研究[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(12): 821.
 [4] 张英丰, 周莉玲. 微透析法进行盐酸青藤碱大鼠体外血浆蛋白结合率的测定及超滤法的比较[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(19): 2616.
 [5] 王长虹, 邹小广, 孙殿甲, 等. 盐酸去氢骆驼蓬碱血浆蛋白结合率的测定[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(2): 99.
 [6] 姚媛, 廖琼峰, 曾丽英, 等. 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯表现有水分配系数的测定及 pH 对其的影响[J]. 中药材, 2009, 32(10): 1610.

[责任编辑 蔡仲德]