



# 牡荆素血浆蛋白结合率的测定

童成亮\*, 吴小英

(安徽省食品药品检验所, 安徽 合肥 230051)

**[摘要]** 目的:建立血浆中牡荆素浓度的分析方法,测定牡荆素血浆蛋白结合率。方法:采用平衡透析法透析,利用 HPLC 测定血浆中牡荆素浓度,计算牡荆素与人血浆蛋白结合率,并比较大鼠和人血浆中牡荆素的血浆蛋白结合率。结果:在  $2 \sim 16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 药物浓度对血浆蛋白结合率无显著影响,但牡荆素在大鼠和人的血浆蛋白结合率存在显著性差异,牡荆素与人的血浆蛋白结合率高于与大鼠血浆蛋白结合率。结论:牡荆素与血浆蛋白具有较强的结合。

**[关键词]** 牡荆素;血浆蛋白结合率;平衡透析法

牡荆素(vitexin)是从山楂叶中分离提取出来的一种活性单体成分<sup>[1]</sup>。经研究<sup>[2]</sup>牡荆素对缺血性心肌损伤具有良好的保护作用。药物血浆蛋白结合率是药物体内重要参数之一,不仅影响药物代谢动力学,还密切关系到药物的药理作用强度、作用机制等。作者曾首次报道<sup>[3]</sup>牡荆素在大鼠体内中血浆蛋白结合的情况,本研究继续采用平衡透析法测定了牡荆素的人血浆蛋白结合率,并与大鼠血浆蛋白结合率进行比较,为其进一步研究提供依据。

## 1 材料

牡荆素原料、牡荆素对照品(合肥七星医科科技有限公司,纯度分别为 98.7%,99.5%);柚皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110722-200309);病毒灭活血浆[合肥市红十字会中心血站,批号 20100719,A 型,Rh(D)阴性(-)];纯化水;甲醇、乙腈为色谱纯;其余试剂均为分析纯。

戴安 ULTIMATE 3000 全自动高效液相色谱仪及变色龙色谱工作站;戴安  $C_{18}$  色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm);HC-2062 高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);MULTIVAP 118 氮吹仪(美国 Organomation 公司);透析袋(截留相对分子质量 12 000 ~ 14 000,上海源聚生物科技有限公司)。

## 2 方法与结果

**[稿件编号]** 20111007009

**[基金项目]** 国家科技型中小企业技术创新基金项目(06C26213401230)

**[通信作者]** \*童成亮,副主任药师,研究方向为药代动力学, Tel/Fax:(0551)3368775, E-mail:tcalls@163.com

## 2.1 溶液的配制

空白透析液的配制:磷酸氢二钾 14.11 g,磷酸二氢钾 2.59 g,氯化钠 1.99 g,加水溶解至 1 L,即得。

牡荆素贮备液配制:牡荆素对照品约 10.2 mg,置 20 mL 量瓶中,加  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠 2 mL,超声使溶解,并加水至刻度线,摇匀,即得贮备液质量浓度为  $0.51 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,置于冰箱冷藏备用。

牡荆素标准溶液的配制:分别精确取 10,20,100,200,500,1 000 μL 牡荆素贮备液于 10 mL 量瓶中,用水定容至刻度,得  $0.51, 1.02, 5.1, 10.2, 25.5, 51.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的牡荆素对照溶液。

内标溶液的配制:精密称取柚皮苷对照品约 4 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇超声使溶解,并加水稀释至刻度线,摇匀,即得。所配制内标溶液质量浓度为  $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,置于冰箱冷藏备用。

## 2.2 血浆样品的处理

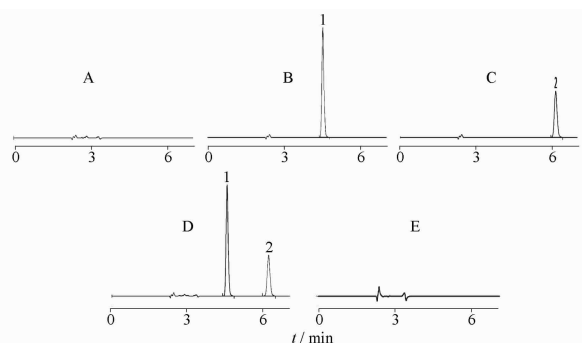
精密量取血浆样品 100 μL,置 2 mL 离心管中,再依次精密加水 100 μL 和内标液 50 μL,涡旋混匀。精密加入乙腈 0.5 mL,涡旋 1 min,5 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,取上清液,40 °C 下氮气吹干,残余物用流动相 100 μL 溶解,15 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  高速离心 5 min 后取上清液 5 μL 进样。

## 2.3 HPLC 色谱条件

戴安  $C_{18}$  色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相为乙腈-10 mmol ·  $\text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾溶液(26:74,用磷酸调 pH 至 3.0),流速为  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,检测波长为 340 nm,柱温 25 °C;进样量 5 μL。

## 2.4 方法学验证

**2.4.1 专属性考察** 分别取空白血浆、牡荆素对照品、内标溶液及空白透析液,按照 2.2 项下方法处理,在 2.3 项下的色谱条件下测定,色谱图见图 1。空白血浆、空白透析液及内标溶液在此条件下对牡荆素的测定无干扰。



A. 空白人血浆; B. 牡荆素对照品溶液; C. 内标溶液; D. 人血浆样品 + 内标溶液; E. 空白透析液; 1. 牡荆素; 2. 柚皮苷。

图 1 牡荆素色谱图

Fig. 1 Chromatograms of vitexin

**2.4.2 透析袋内液方法学验证** 取 6 支 2 mL 离心管,精密加入空白血浆 100  $\mu\text{L}$ ,再分别精密加入 0.51, 1.02, 5.1, 10.2, 25.5, 51.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的牡荆素对照溶液 100  $\mu\text{L}$  和内标溶液 50  $\mu\text{L}$ ,涡旋混匀,按 2.3 项下操作,依法测定,分别记录牡荆素和内标峰面积,以牡荆素峰面积( $A_1$ )对内标峰面积( $A_s$ )比值为纵坐标( $Y$ ),以牡荆素血浆浓度  $C$  为横坐标( $X$ )进行线性回归,得标准曲线方程为  $Y = 0.2288X - 0.0357, r = 0.9999 (n = 6)$ ;线性范围 0.5 ~ 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;定量限为 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;高、中、低 3 种质量浓度(1.0, 10.0, 50.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )的样品相对回收率为 100.5% ~ 102.6% ( $n = 5$ ),绝对回收率为 75.2% ~ 88.0% ( $n = 5$ );日内精密 RSD 均小于 3.0% ( $n = 7$ ),日间精密 RSD 均小于 4.0% ( $n = 5$ )。

**2.4.3 透析袋外液方法学验证** 取 2.1 项下 6 个不同浓度的牡荆素标准溶液,分别精密量取 5  $\mu\text{L}$  进样,记录牡荆素峰面积,以牡荆素峰面积( $A_1$ )为纵坐标  $Y$ ,以牡荆素浓度( $C$ )为横坐标  $X$  进行线性回归,得标准曲线方程为  $Y = 0.2249X + 0.0032, r = 0.9999 (n = 6)$ ;线性范围 0.5 ~ 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;定量限为 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;高、中、低 3 种质量浓度(1.0, 10.0, 50.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )的样品相对回收率为

99.4% ~ 100.5% ( $n = 5$ ),绝对回收率为 98.2% ~ 100.4% ( $n = 5$ );日内精密 RSD 均小于 2.0% ( $n = 7$ ),日间精密 RSD 均小于 3.0% ( $n = 5$ )。

**2.5 牡荆素血浆蛋白结合率测定**

**2.5.1 透析袋的预处理** 把透析袋剪成 10 cm 长度的小段,在 500 mL 2% 的碳酸氢钠和 EDTA · 2Na 溶液中将透析袋煮沸 10 min,用蒸馏水彻底清洗,然后再在 500 mL 的 1 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA · 2Na (pH 8.0) 溶液中煮 10 min。冷却后,用蒸馏水彻底清洗,置于 30% 乙醇中,放于 4 °C 冰箱备用。

**2.5.2 平衡透析方法** 试验前先将预处理后的透析袋用蒸馏水漂洗干净,在空白透析液中 4 °C 浸泡 24 h。取一端用透析袋夹夹紧的透析袋,除去袋内外水份,精密吸取 1 mL 空白血浆加至透析袋中,夹紧袋口,悬浮于盛有 20 mL 含牡荆素分别 2, 4, 8, 16  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的透析液的培养皿中,每种浓度平行试验 5 份。调整透析袋位置,使透析袋内外液面应保持同一水平,并避免贴壁,加盖密闭,置于 4 °C 冰箱中放置 72 h。透析结束时,吸取透析外液,加入等量 3% 三氯醋酸溶液检查是否有血浆蛋白漏出,若有白色絮状物析出,则该样品作废。无血浆蛋白漏出者,分别取透析袋内外样品并测定牡荆素浓度,血浆蛋白结合率 = (1 - 袋外浓度/袋内浓度) × 100%。

**2.5.3 测定结果** 袋内血浆样品溶液按照 2.2 项处理,测定袋内药物的牡荆素峰面积和内标峰面积,再根据 2.4.2 项内液标准曲线计算平衡后袋内药物浓度。外液直接进样按 2.4.3 项外液标准曲线计算出外液浓度。根据袋内外溶液浓度计算人血浆蛋白结合率,见表 1。

表 1 牡荆素血浆蛋白结合率测定结果( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 1 Protein binding rate of vitexin in plasma( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	血浆蛋白结合率/%	
	大鼠血浆	人血浆
2.027	63.31 ± 1.07	85.65 ± 1.66 <sup>1)</sup>
4.054	64.93 ± 0.49	87.15 ± 0.86 <sup>1)</sup>
8.108	67.25 ± 0.54	85.25 ± 0.58 <sup>1)</sup>
16.218	63.88 ± 0.40	82.83 ± 1.65 <sup>1)</sup>

注:与大鼠血浆组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

各浓度的血浆蛋白结合率经统计分析,结果无显著性差异,表明牡荆素血药浓度在 2 ~ 16  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



$L^{-1}$ , 浓度因素对大鼠和人血浆蛋白结合率均无显著性影响, 牡荆素在大鼠血浆中的蛋白结合率约为 65%, 在人血浆中的蛋白结合率约为 85%; 不同血浆种类的血浆蛋白结合率经统计分析, 结果存在显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 表明不同种属之间的血浆蛋白结合率是不同的, 牡荆素与人血浆蛋白结合率要显著高于与大鼠的血浆蛋白结合率。

### 3 讨论

#### 3.1 透析袋的选择

合适的透析袋应该既能确保药物分子能够及时释放、对药物的物理吸附低, 又要确保血浆中的成分及内源性物质在透析的过程中能较稳定存在于透析袋内, 避免大量进入透析外液, 尽可能地接近体内环境, 同时保持恒定的环境温度、pH、离子强度, 在此基础上体外测得的数据才能最大限度地反映体内情况。本实验中采用截留相对分子质量为 12 000 ~ 14 000 的透析膜进行实验, 由 HPLC 图可知, 与空白透析液的样品相比, 透析外液的样品图谱基线较平稳, 无明显杂质峰, 表明血浆中并无大量内源性物质从透析袋中渗出。

此外, 参照文献[4]方法, 考察透析膜对药物的物理吸附作用。结果为透析平衡 72 h 后, 低、中、高 3 种质量浓度 ( $2, 8, 16 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ ) 的样品透析袋吸附率 (透析袋吸附的药物量占总药量的百分比) 分别为  $(1.65 \pm 0.98)\%$ ,  $(1.12 \pm 1.06)\%$ ,  $(0.93 \pm 0.81)\%$ , 表明存在极微量的吸附作用, 并且吸附作用不受浓度的影响, 因此药物与透析袋结合可忽略不计, 采用该型号的透析袋以平衡透析法测定牡

荆素的血浆蛋白结合率是可行的。

#### 3.2 透析平衡时间的选择

按 2.5.2 方法试验, 在含牡荆素质量浓度为 2, 8, 16  $\text{mg} \cdot L^{-1}$  透析液中透析, 并分别于 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下平衡 24, 48, 72, 96 h 后结束试验, 分别测定透析袋内外的牡荆素浓度, 计算血浆蛋白结合率。结果表明试验放置 72 h 后, 各浓度试验组的牡荆素血浆蛋白结合率趋于不变, 因此选择平衡透析时间为 72 h。

#### 3.3 小结

本实验结果表明, 牡荆素与人血浆蛋白结合率约为 85%, 属于高血浆蛋白结合药物, 且在试验浓度范围内血浆蛋白结合率与透析液中药物浓度无关。高血浆蛋白结合率药物只有少部分游离药物参与体内药物处置, 继而发生药理作用, 但如果体内出现影响药物血浆蛋白结合率的病变时, 就有可能对药物的药理作用产生重大影响。因此, 牡荆素在临床用药时要时刻注意病理因素及与其他药物合用时对血浆蛋白结合率的影响。

#### [参考文献]

- [1] 宋少江, 陈佳, 寇翔, 等. 山楂叶的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(2): 88.
- [2] Vierling W, Brand N, Gaedcke F, et al. Investigation of the pharmaceutical and pharmacological equivalence of different hawthorn extracts[J]. Phytomedicine, 2003(10): 8.
- [3] 童成亮, 刘晓东. 牡荆素在大鼠体内的药代动力学[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(1): 65.
- [4] 刘颖, 陈志强, 陶蓓蕾, 等. 蟾毒灵血浆蛋白结合率的测定[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 2817.

## Determination of plasma protein binding rate of vitexin

TONG Chengliang\*, WU Xiaoying

(Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an analytical method on vitexin concentration in plasma to determine the plasma protein binding rate of vitexin. **Method:** The equilibrium dialysis method and HPLC were adopted to determine vitexin concentration in plasma, calculate human plasma protein binding rate of vitexin and compare rat and human plasma protein binding rates of vitexin. **Result:** At  $2-16 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ , there was no significant difference in the plasma protein binding rate. But the human plasma protein binding rate of vitexin was higher than its rat plasma protein binding rate, indicating a significant difference in rat and human plasma protein binding rates of vitexin. **Conclusion:** Vitexin has a higher protein binding rate with both rat plasma and human plasma.

[Key words] vitexin; plasma protein binding rate; equilibrium dialysis method

doi:10.4268/cjmm20121430

[责任编辑 陈玲]