

- [7] 席佳, 唐海谊, 郑颖. 齐墩果酸口服制剂及其体内药动学研究进展[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(6): 507-515.
- [8] 徐君, 吴连花, 徐文芬, 等. HPLC 法测定对坐叶药材中齐墩果酸和熊果酸[J]. 中成药, 2012, 34(4): 766-767.
- [9] 郑茂, 范博, 丁红. 高效液相色谱法测定不同产地白花蛇舌草中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. 中国药物与临床, 2010, 10(3): 261-263.
- [10] Jeong DW, Kim YH, Kim HH, et al. Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats[J]. Biopharm Drug Dispos, 2007, 28(2): 51-57.
- [11] 范玉玲, 崔福德, 张静. 齐墩果酸钠在大鼠肠道吸收动力学研究[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(9): 1147-1150.
- [12] 王敏, 石晓滢, 霍继明, 等. 扶正口服液在家兔体内的代谢动力学研究[J]. 中国微生态学杂志, 2000, 12(5): 280.
- [13] 谢珺, 温明, 刘建明. 齐墩果酸口服自微乳在大鼠体内的药动学研究[J]. 中成药, 2012, 34(2): 257-260.

(编辑: 梁进权)

吴茱萸碱和吴茱萸次碱血浆蛋白结合率的测定

雷小娟, 王 森, 朱卫丰(江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004)

摘要: 目的 建立兔血浆中吴茱萸碱和吴茱萸次碱浓度的测定方法, 测定吴茱萸碱和吴茱萸次碱的血浆蛋白结合率。**方法** 采用平衡透析法测定吴茱萸碱和吴茱萸次碱血浆蛋白结合率, 利用 HPLC 测定血浆中吴茱萸碱和吴茱萸次碱浓度。**结果** 吴茱萸碱在 0.208, 1.04, 2.08 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下的血浆蛋白结合率分别为 $(38.5\pm 1.7)\%$ 、 $(36.4\pm 1.0)\%$ 、 $(39.0\pm 1.0)\%$, 吴茱萸次碱在 0.235, 1.18, 2.345 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下的血浆蛋白结合率分别为 $(40.6\pm 3.2)\%$ 、 $(39.3\pm 4.5)\%$ 、 $(41.5\pm 1.2)\%$, 吴茱萸碱和吴茱萸次碱的浓度对血浆蛋白结合率无显著影响。**结论** 吴茱萸碱和吴茱萸次碱与兔血浆蛋白具有较低等强度的结合。

关键词: 吴茱萸碱; 吴茱萸次碱; 血浆蛋白结合率; 平衡透析法

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)03-0271-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.03.017

Determination of Plasma Protein Binding Rate of Evodiamine and Rutaecarpine

LEI Xiaojuan, WANG Sen, ZHU Weifeng (Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Materia, Ministry of Education, Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China)

Abstract: **Objective** To establish an analytical method for evodiamine and rutaecarpine concentration in rabbit plasma, and to determine the plasma protein binding rate of evodiamine and rutaecarpine. **Methods** The equilibrium dialysis method was adopted to determine evodiamine and rutaecarpine concentration in plasma, and HPLC was used to calculate rabbit plasma protein binding rate of evodiamine and rutaecarpine. **Results** The protein binding rate of evodiamine was $(38.5 \pm 1.7)\%$, $(36.4 \pm 1.0)\%$, $(39.0 \pm 1.0)\%$ when the plasma concentration of evodiamine was 0.208, 1.04, 2.08 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and the protein binding rate of rutaecarpine was $(40.6 \pm 3.2)\%$, $(39.3 \pm 4.5)\%$, $(41.5 \pm 1.2)\%$ when the plasma rutaecarpine concentration was 0.235, 1.18, 2.345 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. The binding rates of evodiamine and rutaecarpine were not correlated with the plasma concentration. **Conclusion** Evodiamine and rutaecarpine have a lower protein binding rates with rabbits plasma.

Keywords: Evodiamine; Rutaecarpine; Plasma protein binding rate; Equilibrium dialysis method

收稿日期: 2012-11-16

作者简介: 雷小娟, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药外用制剂。Email: leixiaojuan85@126.com。通讯作者: 朱卫丰, 教授, 研究方向: 中药经皮给药新剂型新技术研究。Email: zwf0322@126.com。

基金项目: 江西省科技支撑计划项目(2010JX00095); 南昌市科技支撑计划项目(2010-KJZCJH-YYYYLQX-108); 江西省研究生创新专项资金项目(YC2011-S111)。

吴茱萸碱(Evodiamine, Evo)和吴茱萸次碱(Rutaecarpine, Rut)是吴茱萸的吲哚喹诺酮类生物碱成分,药理学研究^[1]表明,Evo和Rut具有扩张血管、增加血流、改善微循环、抗炎镇痛等作用。药物血浆蛋白结合率是药物在体内的重要参数之一,不仅影响药物代谢动力学,还关系到药物的药理作用强度、作用机制等。Evo和Rut的家兔药动学研究^[2]表明,两者的血药浓度均较低。但关于Evo和Rut的血浆蛋白结合率未见文献报道。为此,本研究采用平衡透析法测定了Evo和Rut的血浆蛋白结合率,为其进一步的体内研究提供参考。

1 仪器与材料

Agilent1200 高效液相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;SZ-93 自动双重纯水蒸馏器,上海亚荣生化仪器厂;HH-2 数显恒温水浴锅,常州国华电器有限公司;电子分析天平(万分之一、十万分之一),北京赛多利斯科学仪器有限公司;3-18K 高速冷冻离心机,德国 Sigma 公司;MD-10 透析袋(直径 10 mm,分子截留量 8000 D),美国 Solarbio 公司。

吴茱萸碱对照品(批号:110802-200606)、吴茱萸次碱对照品(批号:110801-201006),中国药品生物制品检定所;吴茱萸碱、吴茱萸次碱,南京泽朗医药科技有限公司,纯度分别为 80.3 %、87.5 %;磷酸二氢钾、氢氧化钠、氯化钠、吐温 80,均为分析纯,上海国药集团试剂有限公司;甲醇、乙腈,色谱纯,美国 Tedia 公司,其他试剂为分析纯。

日本大耳兔,体质量(2.0 ± 0.1) kg,雌雄各半,江西省龙平兔业,许可证号:SCXK(赣)2009-0001。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液的配制 分别精密称取 Evo 和 Rut 对照品各 10.4、11.8 mg 于 10 mL 容量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,得混合对照品贮备液(含 Evo $1.04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、Rut $1.18 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),于 4 °C 冰箱保存。再分别取适量贮备液用甲醇稀释成不同质量浓度,得系列浓度混合对照品溶液。

2.1.2 空白透析液的配制 取磷酸二氢钾 2.72 g、氯化钠 8.8 g,加入适量双蒸水溶解,加入 5.0 g 吐温 80,加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液适量,调节 pH 值至 7.4,补水至 1000 mL,即得 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(内含 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠和体积分数 0.5 %的吐温 80),用 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,作为空白

透析液。

2.1.3 空白兔血浆的制备 选取健康日本大耳兔,使用抗凝处理的注射器兔心脏采血适量,迅速转移至抗凝处理的离心管中,以 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 高速离心 10 min,用移液器将血浆吸取移至 10 mL 离心管中, -20 °C 冷冻备用。

2.2 色谱条件 色谱柱:大连依利特 Hypersil ODS2 C_{18} 柱($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$);流动相为乙腈-水(48:52),检测波长为 225 nm,流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温为 25 °C,进样量为 20 μL 。

2.3 样品处理

2.3.1 血浆样品的处理 将兔血浆取出,自然解冻,取兔血浆 100 μL ,加甲醇 400 μL ,沉淀血浆蛋白,涡旋混合 30 s,以 $16000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液加入 0.5 %吐温 80 即得空白血浆样品。

2.3.2 透析样品处理 精密吸取透析平衡后的袋内血浆或袋外透析液 200 μL ,置 1.5 mL 离心管中,加入甲醇 500 μL ,涡旋 30 s, $16000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 高速离心 15 min,取上清液,按照 2.2 项下条件进样 20 μL 进行分析。

2.3.3 高、中、低浓度对照品处理 精密吸取空白血浆或空白透析液 200 μL ,置 1.5 mL 离心管中,分别加入高、中、低浓度的混合对照品溶液 200 μL ,加入甲醇 500 μL ,涡旋 30 s, $16000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 高速离心 15 min,取上清液按照 2.2 项下条件进样 20 μL 进行分析。

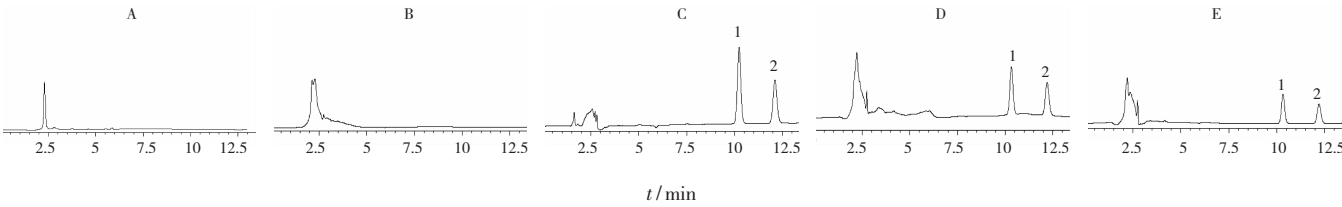
2.4 方法学验证

2.4.1 方法专属性考察 分别取空白血浆、空白透析液及含 Evo、Rut 的血浆样品或透析液样品,按照 2.3 项下方法处理样品,2.2 项下色谱条件测定,可见空白血浆、空白透析液在此条件下对 Evo 和 Rut 的测定无干扰。Evo、Rut 的色谱图见图 1。

2.4.2 标准曲线的绘制

(1)透析外液标准曲线 取 200 μL 空白透析液,分别加入 200 μL 系列浓度混合对照品溶液,按照 2.3.3 项下方法进行处理,以各成分的峰面积与浓度进行线性回归,得到回归方程。Evo: $Y=231.44X-9.0390$, $r=0.9996$,线性范围为: $0.04 \sim 10.40 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,最低检测限为 $0.035 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; Rut: $Y=136.31X-4.8882$, $r=0.9996$,线性范围为: $0.05 \sim 11.80 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,最低检测限为 $0.014 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

(2)透析内液标准曲线 取 200 μL 空白血浆,分别加入 200 μL 系列浓度混合对照品溶液,按照



注：A. 空白血浆；B. 空白透析液；C. 对照品；D. 透析内液；E. 透析外液；1. Evo；2. Rut

图 1 Evo、Rut 的 HPLC 图

Figure 1 Chromatograms of Evo and Rut by HPLC

2.3.3 项下方法进行处理，以各成分的峰面积与浓度进行线性回归，得回归方程。Evo： $Y=223.91X+3.4437$ ， $r=0.9997$ ，线性范围： $0.04\sim10.40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；Rut： $Y=132.29X+1.2304$ ， $r=0.9994$ ，线性范围： $0.05\sim11.80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.4.3 精密度的试验 取空白血浆 200 μL ，按照 2.3.3 项下方法进行操作，配制成低、中、高浓度的血浆混合对照品，1 d 内分别进样 6 次，计算日内相对标准偏差(RSD)，连续测定 5 d，计算日间 RSD，考察方法的精密度。结果 RSD 均小于 3.0 %。

2.4.4 稳定性考察 取空白血浆 200 μL ，按照 2.3.3 项下的方法进行处理，配制成高、中、低 3 种浓度的混合对照品血浆样品，考察血浆样品预处理后室温放置 24 h 的稳定性，结果表明高、中、低浓度下，Evo 的稳定性 RSD 分别为 0.73 %、2.81 %、1.65 %，Rut 的稳定性 RSD 分别为 1.36 %、2.90 %、2.56 %。

2.4.5 提取回收率试验 取空白血浆 200 μL (3 份)，按照 2.3.3 项下方法操作，配制成高、中、低浓度的血浆混合对照品溶液，每个浓度 3 个样本，每个样本进样 3 次，另外再取空白血浆 200 μL (3 份)，在不加入混合对照品的前提下，按照 2.3.3 项下方法进行处理，取上清液加入 200 μL 高、中、低浓度的混合对照品溶液，涡旋混匀后，过滤，进样分析，以每一浓度两种处理方法的峰面积的比值计算提取回收率。Evo 在高、中、低 3 种质量浓度下的提取回收率分别为 $(89.1\pm1.9)\%$ 、 $(88.9\pm7.6)\%$ 、 $(94.1\pm0.2)\%$ ，Rut 在高、中、低 3 种质量浓度下的提取回收率分别为 $(88.3\pm1.4)\%$ 、 $(87.9\pm7.7)\%$ 、 $(79.1\pm0.2)\%$ 。

2.5 Evo 和 Rut 的血浆蛋白结合率的测定

2.5.1 透析袋预处理 把透析袋(MD-10)剪成约 10 cm 的小段，在 500 mL 的 2 % (W/V) 的碳酸氢钠和 1 mmol·L⁻¹ EDTA·2Na (pH=8.0) 中将透析袋煮沸 10 min，用蒸馏水彻底清洗透析袋，然后放在 500 mL 的 1 mmol·L⁻¹ EDTA·2Na (pH=8.0) 中将之煮

沸 10 min，冷却后，置于 30 % (V/V) 的乙醇中，放于 4 ℃ 冰箱，必须确保透析袋始终浸没在溶液内，取用透析袋必须戴手套。

2.5.2 平衡透析实验方法^[3] 将预处理过的透析袋用蒸馏水清洗干净，在空白透析液中室温浸泡 24 h，吸干水分后一端结扎，在透析袋中加入 200 μL 的空白血浆，留一小段气泡，将多余气泡排尽，并将另一端用透析袋夹夹紧，悬浮于装有 3 mL 含 0.208，1.04，2.08 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Evo 和 0.235，1.18，2.345 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Rut 的低、中、高质量浓度的透析液中，调节透析袋的高度，使其内外液面保持在同一水平，避免透析袋贴壁，加盖密闭，用封口膜封口，放置于 37 ℃ 恒温水浴中，透析结束时，吸取透析外液，加入等量 3 % 的高氯酸溶液检查有无血浆蛋白漏出，若有白色絮状物析出，则该样品作废。无血浆蛋白漏出者，分别吸取透析袋内外液适量，按 2.3.2 项下处理，进行色谱分析，测定透析袋内血浆药物浓度 (D_i) 和透析袋外液药物浓度 (D_r)，根据下式计算药物的血浆蛋白结合率，结果见表 1。

血浆蛋白结合率 $= (D_i - D_r) / D_i \times 100\%$

表 1 Evo、Rut 的血浆蛋白结合率 ($\bar{x}\pm s$ ， $n=5$)

样品浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		血浆蛋白结合率 / %	
Evo	Rut	Evo	Rut
2.080	2.345	39.0 ± 1.0	41.5 ± 1.2
1.040	1.180	36.4 ± 1.0	39.3 ± 4.5
0.208	0.235	38.5 ± 1.7	40.6 ± 3.2

2.5.3 透析平衡时间的确定^[4] 将预处理过的透析袋用蒸馏水清洗干净，在空白透析液中室温浸泡 24 h，吸干水分后一端结扎，精密吸取 200 μL 空白透析液至透析袋内，吸取 3 mL 含药透析液至 4 mL 离心管中，将透析袋放入离心管中，用透析袋夹将另一端夹紧，调节液面高度，使透析袋内外液面持平，并且避免透析袋碰壁，用封口膜封口，置于 37 ℃ 水浴，分别在 3，9，12，24，30 h，吸取透析袋内外

液适量,按 2.3.2 项下处理,进行色谱分析,测定透析袋内外液的浓度,以当日标准曲线计算透析袋内外 Evo、Rut 的质量浓度,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 24 h 时袋内外溶液中 Evo、Rut 的质量浓度相等,表明扩散 24 h 已达到平衡,因此设定平衡透析时间为 24 h。

2.5.4 透析袋对药物的吸附作用 按 2.5.2 项下方法,透析袋内精密加入 200 μ L 空白透析液代替血浆,放入盛有 3 mL 含药透析液的离心管内,平行 5 份;另取 5 支离心管,分别加入 3 mL 含药透析液,无透析袋。将上述离心管置 37 $^{\circ}$ C 水中水浴 24 h 至平衡,按 2.3.2 项下处理样品,进行色谱分析,测定透析外液药物浓度 ($n=5$),根据文献^[5]计算方法计算透析袋对药物的吸附率,Evo、Rut 的吸附率分别为 0.62 % 和 1.21 %,表明透析袋对两种成分几乎无吸附作用,可忽略不计。

3 讨论

平衡透析法基于药物结合的平衡原理,是测定药物游离浓度最常用的方法。该方法具有简单、经济、受实验因素干扰小等优点,是研究药物血浆蛋白结合率的经典方法。所以,本实验采用此法进行 Evo、Rut 的血浆蛋白结合率研究。

预试验及前期研究^[2]表明,Evo 和 Rut 不溶于水溶液,低浓度含药透析液明显可见药物沉淀析出。为增大药物在透析液中的溶解度,本研究中参考文献^[6-7]方法,加入了体积分数 0.5 % 的吐温 80,有效地

提高了 Evo 和 Rut 在透析液中的溶解度。

本研究建立了兔血浆中 Evo 和 Rut 浓度的测定方法,采用平衡透析法测定 Evo 和 Rut 血浆蛋白结合率,经方法学验证,该方法可行。在本研究浓度范围内,Evo、Rut 与兔血浆的蛋白结合率分别约为 38 % 和 40 %,属于低血浆蛋白结合,且随药物浓度的增加无明显变化趋势,用 SPSS 16.0 进行方差分析显示,结果无统计学意义,表明在该浓度范围内其血浆蛋白结合率无浓度依赖性。至于 Evo 和 Rut 在不同种属间的血浆蛋白结合率是否存在差异,如兔与人血浆,有待进一步深入研究,从而更好地指导吴茱萸及其制剂的合理用药和临床用药安全。

参考文献:

- [1] 严春临,张季,薛贵平. 中药吴茱萸药理作用研究概况[J]. 河北北方学院学报,2009,26 (1): 77-79.
- [2] 栾连军,裴国丽,程翼宇. 吴茱萸碱和吴茱萸次碱在家兔体内的药动学研究[J]. 中国药理学杂志,2006,41(1): 48-50.
- [3] 杜英峰,靳怡然,许慧君,等. 冬凌草甲素在不同种属血浆中蛋白结合率的 HPLC 法测定[J]. 药物分析杂志,2012,32(3): 383-387.
- [4] 杨晓宁,禹玉洪,李阳,等. HPLC 法测定丁香酚与大鼠血浆蛋白的结合率[J]. 中草药,2010,41(3): 391-393.
- [5] 高秀荣,蒋学华,王婷. HPLC 法测定蝙蝠葛碱与大鼠和人血浆蛋白的结合率[J]. 中国药房,2011,22(31): 2894-2897.
- [6] Lee KJ, Mower R, Hollenbeck T. Modulation of nonspecific binding in ultrafiltration protein binding studies[J]. Pharmaceutical Research, 2003,20(7): 1015-1021.
- [7] 吴海. 吴茱萸次碱吸收机理研究[D]. 成都: 四川大学,2007.

(编辑: 梁进权)

川芎嗪自乳化缓释固体分散体在兔体内的药动学研究

陈晓丹,王利胜,陈 豆,吕耿彬,涂 星,吴俊洪(广州中医药大学中药学院,广东 广州 510006)

摘要: **目的** 研究川芎嗪自乳化缓释固体分散体(TMP-SESD)及普通缓释固体分散体(TMP-SD)在兔体内的药动学特征。**方法** 6 只新西兰兔随机分为 2 组,采用自身交叉对照实验,单剂量口服 TMP-SESD 和 TMP-SD 后,采用高效液相色谱法测定血浆中 TMP 的浓度,DAS2.1 数据处理软件计算药动学参数。**结果** TMP-SESD 和 TMP-SD 给药后,药动学参数如下: $t_{\max}$ 分别为 4 h 和 6 h; $C_{\max}$ 分别为 $(3.217 \pm 0.4581) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(6.105 \pm 0.298) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{AUC}_{0-\infty}$ 分别为 $(63.877 \pm 3.786) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$ 和 $(39.067 \pm 2.971) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$; 与 TMP-SD 比较,TMP-SESD 的相对生物利用度为 $(163.5 \pm 9.58) \%$ 。**结论** 家兔体内川芎嗪的药动学规律均符合一级吸收二室模型,与普通缓释固体分散体相比,自乳化缓释固体分散体 $C_{\max}$ 和 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 均较高,说明自乳化缓释固体分散体能显著提高药物

收稿日期: 2012-07-16

作者简介: 陈晓丹,女,硕士研究生,研究方向: 药物新剂型与新技术研究。Email: 512492324@qq.com。通讯作者: 王利胜,博士,教授,硕士生导师,研究方向: 药物新剂型与新技术研究。Email: wlis68@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30873443); 广东省科技计划项目(2010B030700039)。