

巴戟甲素表观油水分配系数和血清蛋白结合率的测定

陈永刚¹ 林励² 吴金虎¹

(1. 武汉市第三医院 药学部, 湖北 武汉 430060; 2. 广州中医药大学 中药学院, 广东 广州 510006)

摘要:目的 测定巴戟甲素的表观油水分配系数和血清蛋白结合率,为该化合物体内药动学研究提供依据。方法 应用 HPLC-ELSD 检测仪,采用摇瓶法测定巴戟甲素表观油水分配系数,超滤法测定其血清蛋白结合率。结果 巴戟甲素在正辛醇-水(体积比 1:1、2:1)中的表观油水分配系数均值为 0.052 5 ($\log_{papp} = -1.28$),在正辛醇-磷酸盐缓冲液(pH 6.8,体积比 1:1、2:1)中均值为 0.050 7 ($\log_{papp} = -1.295$)。测定的巴戟甲素与牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)和大鼠血清蛋白结合率分别为 42.15%、40.67%、30.89%。结论 巴戟甲素水溶性较强,在正辛醇-水中的表观油水分配系数与在正辛醇-磷酸盐缓冲液中基本一致;与 BSA、HSA 结合率高于其与大鼠血清蛋白的结合率,提示巴戟甲素可能主要与血清中的白蛋白产生特异性结合。

关键词: 巴戟甲素; 表观油水分配系数; 蛋白结合率

中图分类号: R 284.1 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1006-8783.2011.01.012

文章编号: 1006-8783(2011)01-0005-05

Determination of the apparent oil-water partition coefficient and serum protein binding rate of Bajijiasu

CHEN Yong-gang¹, LIN Li², WU Jin-hu¹

(1. Department of Pharmacy, The Third Hospital of Wuhan, Wuhan, Hubei 430060, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: Objective To determine the apparent oil-water partition coefficient and serum protein binding rate of Bajijiasu which might support for its pharmacokinetics research *in vivo*. **Methods** HPLC-ELSD was used for the assay of Bajijiasu and the partition coefficients were determined by shaking flask method. The ultrafiltration method was employed to obtain the serum protein binding rates. **Results** The apparent oil-water partition coefficient in octanol/water system was 0.052 5 ($\log_{papp} = -1.28$) and 0.050 7 ($\log_{papp} = -1.295$) in octanol/phosphate buffer (pH = 6.8) system. The serum protein binding rates of Bajijiasu with BSA, HSA and rat serum protein were 42.15%, 40.67%, 30.89%, respectively. **Conclusion** Bajijiasu was a hydrotropic substance. The partition coefficients in octanol/water system is identical with octanol/phosphate buffer (pH = 6.8) system. The serum protein binding rate of Bajijiasu with BSA, HAS was significantly higher than other rat serum protein, which showed that Bajijiasu may have a kind of specific binding with albumin in serum.

Key words: Bajijiasu; apparent oil-water partition coefficient; serum protein binding rate

收稿日期: 2010-01-03

基金项目: 海南省重点科技项目(090603)

作者简介: 陈永刚(1975-) 男, 博士, 主管药师, 从事中药资源开发利用与新药研究, Email: cyg508@163.com; 通讯作者: 林励(1954-) 男, 研究员, 博士生导师, 从事中药资源开发利用与新药研究, 电话: 020-39358270, Email: lwyl@gzhtcm.edu.cn。

网络出版时间: 2011-01-21 16:23 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1413.R.20110121.1623.017.html>

巴戟甲素是从南药巴戟天中分离得到的一种低聚糖类活性成分^[1],前期已完成的对衰老模型大鼠影响的药理实验证明其有良好的生物活性^[2-8]。但与巴戟甲素活性大小相关的晶型、溶解度、蛋白结合率、表观油水分配系数、胃肠道稳定性等理化性质尚未作系统研究,无法为其体内药动学特征及药理作用强度研究提供参考。

药物的表观油水分配系数是确定药物能否有效透过生物膜从而发挥疗效的重要参数;蛋白结合率也是药物体内作用过程研究的重要参数之一^[9]。二者均能影响药物在体内的分布、排泄和代谢速率、消除半衰期等,是临床前药物动力学研究的一项重要内容^[10]。

本试验采用超滤法测定巴戟甲素的血清蛋白结合率^[11-12],摇瓶法测定巴戟甲素表观油水分配系数^[13],以期为巴戟甲素后续的体内药动学研究及其新药开发提供理论依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

美国 Water™ 600 型高效液相色谱仪(Waters™ 600E 型 Pump, ALLtech2000 型蒸发光散射检测器, Millennium32 色谱工作站); HH-4 型数显恒温水浴锅(上海浦东物理光学仪器厂); TGL-18G-C 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); SK-1 快速混匀器(江苏金坛市佳美仪器厂); SHZ-82 恒温振荡器(江苏金南仪器厂); BP211D 型分析天平(Sartorius, 0.01 mg); 3K OMEGA 超滤管(美国 PALL 公司)。

1.2 试剂

巴戟甲素(自制,批号: 20091009,经 HPLC-ELSD 检测纯度为 98.74%); 牛血清白蛋白(BSA)(批号: 021212,上海实生细胞生物技术有限公司进口分装); 人血清白蛋白(HSA)(批号: 20011001,上海生物制品研究所); 乙腈为色谱纯(Dikma 公司),水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

1.3 实验动物

SD 大鼠,雄性,体质量 210 g,购自广州中医药大学实验动物中心,合格证号: 0055729,实验动物生产许可证号: SCXK(粤) 2008-0020。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Phenomenex Luna NH₂ 色谱柱(250

mm × 4.6 mm 5 μm); 流动相: 乙腈-水(体积比 45: 55); 流速: 1 mL/min; 柱温: 40 °C; ELSD 漂移管温度: 100 °C; N₂ 气体流速: 2.6 L/min。

2.2 对照品贮备液 A 的制备

精密称取干燥恒重的巴戟甲素 50.0 mg 至 5 mL 容量瓶中,加水溶解并定容至刻度,制成每 1 mL 含巴戟甲素 10.0 mg 的对照品贮备液 A,备用。

2.3 BSA 和 HSA 溶液的制备

分别称取 BSA、HSA 适量,用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液溶解,分别制成质量浓度为 42.5 mg/mL 的 BSA 和 HSA 溶液,4 °C 冰箱中保存备用。

2.4 大鼠血清的采集

取健康 SD 大鼠,眼眶取血,置肝素钠处理的 Eppendorf 管中离心(10 000 r/min) 10 min,分离血清,备用。

2.5 标准曲线的制备

精密称取巴戟甲素 20.0 mg,置于 10 mL 量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,得每 1 mL 含巴戟甲素 2.0 mg 的对照品贮备液 B。分别精密吸取对照品贮备液 B 适量,加适量水配制成巴戟甲素质量浓度分别为 0.8、1.6、2.4、3.2、4.0 mg/mL 的系列对照品溶液,注入高效液相色谱仪,依法测定,记录峰面积。以巴戟甲素进样量(*X*) 对数值为横坐标,峰面积积分值(*Y*) 对数值为纵坐标进行线性回归,得回归方程为: $Y = 1.485X + 3.210$, $r = 0.9999$,巴戟甲素在 8.4 ~ 42.0 μg 范围内,质量的对数值和峰面积的对数值呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验

取“2.5”项下巴戟甲素对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,计算峰面积的 *RSD*。结果 6 次测定的峰面积 *RSD* 为 0.43%,表明该方法的精密度良好。

2.7 表观油水分配系数测定

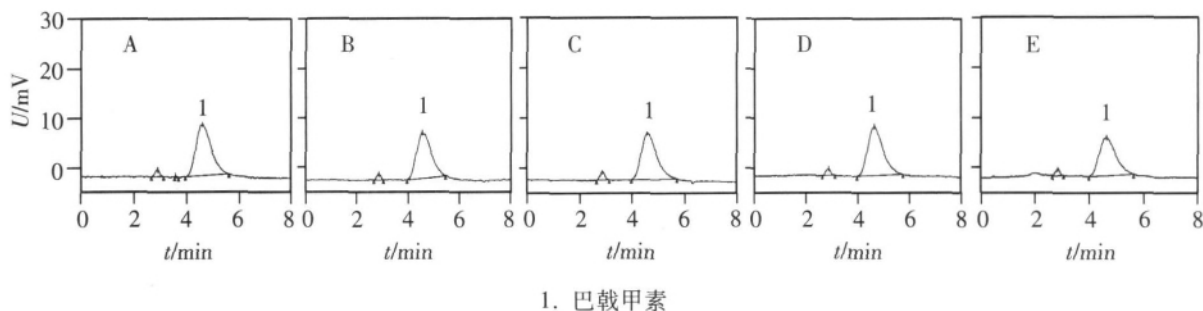
精密称取巴戟甲素适量,分别溶解于被正辛醇饱和的水和被正辛醇饱和的 pH6.8 的磷酸盐缓冲液中,制成每 1 mL 含巴戟甲素 1 mg 的溶液,其质量浓度为 ρ_0 。分别精密量取上述 2 种溶液 1 mL,置 4 支具塞离心管中,按比例加入被水饱和的正辛醇,置振荡器中振荡 24 h,温度保持(25 ± 1) °C,静置分层,冷冻,使水结冰,倾去液态正辛醇,结冰层水浴(80 °C) 加热溶化后,离心(4 000 r/min) 10 min,取水相,加三氯甲烷萃取 3 次,每次 1 mL。水相用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,精密量取 10 μL 注入高效

液相色谱仪,依法测定,记录峰面积,代入标准曲线方程,计算其质量浓度,为 ρ_w 。

以 (1) 式计算油水分配系数。结果见表 1、图 1。

$$\log \rho_{app} = (\rho_0 - \rho_w) / \rho_w \quad (1)$$

式中: ρ_{app} 为巴戟甲素的表观油水分配系数; ρ_0 为巴戟甲素在正辛醇饱和的水中的初始质量浓度, mg/mL; ρ_w 为药物分配平衡时巴戟甲素在水相中的质量浓度, mg/mL。



1. 巴戟甲素
A. 水溶液(油水比例 1:1); B. 水溶液(油水比例 2:1); C. 磷酸盐缓冲溶液(油水比例 1:1);
D. 磷酸盐缓冲溶液(油水比例 2:1); E. 巴戟甲素对照品溶液

图 1 巴戟甲素表观油水分配系数测定 HPLC-ELSD 图谱

Figure 1 HPLC-ELSD chromatograms of Bajijiasu in determining apparent oil-water partition coefficients

表 1 巴戟甲素在不同溶液体系中的油水分配系数

Table 1 Apparent oil-water partition coefficients of Bajijiasu in different systems(n =3)

溶液体系	$V_{\text{油相}} : V_{\text{水相}}$	$\rho_{w(1)}$ / (mg · mL ⁻¹)	$\rho_{w(2)}$ / (mg · mL ⁻¹)	$\rho_{w(3)}$ / (mg · mL ⁻¹)	$\overline{\rho_w}$ / (mg · mL ⁻¹)	ρ_{app}	$\log \rho_{app}$	$\overline{\log \rho_{app}}$
正辛醇-水	1:1	0.959 1	0.959 2	0.959 4	0.959 2	0.053 1	-1.28	-1.28
	2:1	0.959 6	0.959 6	1.042 3	0.987 2	0.052 5	-1.28	
正辛醇-磷酸盐 缓冲液	1:1	0.959 4	0.959 7	0.959 4	0.959 5	0.050 5	-1.30	-1.295
	2:1	0.959 2	0.959 3	0.959 4	0.959 3	0.050 8	-1.29	

注: $\rho_{w(1)}$ 、 $\rho_{w(2)}$ 、 $\rho_{w(3)}$ 分别为 ρ_w 的第 1、2、3 次测量值

由表 1 可知,巴戟甲素在正辛醇-水体系中的油水分配系数均值为 -1.28,在正辛醇-磷酸盐缓冲液 (pH6.8) 体系中均值为 -1.295,二者较接近,说明巴戟甲素具有较强的亲水性。

2.8 蛋白结合率试验

2.8.1 蛋白结合率测定 精密吸取“2.2”项下对照品贮备液 A,分别加 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液配制质量浓度为 6.0、8.0、10.0 mg/mL 的巴戟甲素溶液。分别精密吸取上述 3 种质量浓度的巴戟甲素溶液 50 μ L 于 Eppendorf 离心管中,各加入大鼠血清、BSA、HSA 溶液 250 μ L 漩涡混合均匀,置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中温育 4 h,分别移取 300 μ L 于超滤管中,于 10 000 r/min 下离心 15 min,取超滤液 20 μ L 注入高效液相色谱仪进行测定,记录色谱峰面积,代入标准曲线方程,计算超滤液中巴戟甲素的质量浓度,以 (2) 式计算蛋白结合率。结果见表 2。

$$\text{蛋白结合率} = (\rho_{\text{超滤前}} - \rho_{\text{超滤液}}) / \rho_{\text{超滤前}} \times 100\% \quad (2)$$

式中: $\rho_{\text{超滤前}}$ 为超滤前溶液中巴戟甲素的质量浓度, mg/mL; $\rho_{\text{超滤液}}$ 为超滤液中巴戟甲素质量浓度, mg/mL。

由表 2 可知,巴戟甲素与 BSA、HSA 结合率较接近,而与大鼠血清中蛋白的结合率只有约 31%,显著低于前 2 种白蛋白。

2.8.2 超滤法对蛋白结合率的影响 精密吸取巴戟甲素对照品溶液 (2.0 mg/mL) 适量,分别加入 pH7.4 的磷酸盐缓冲盐稀释配制成为低、中、高 3 个质量浓度的溶液。分别精密量取 0.5 mL 于超滤管中,置于离心机 (10 000 r/min) 离心 15 min,取超滤液 20 μ L 注入高效液相色谱仪,依法测定,记录巴戟甲素峰面积,代入标准曲线计算回收率。结果见表 3。

由表 3 可知,超滤法对结果无影响。

表 2 巴戟甲素与 BSA、HSA 和大鼠血清蛋白结合率测定结果

Table 2 Results of the serum protein binding rates of Bajijiasu with BSA, HSA and rat serum protein ($n=3 \bar{x} \pm s$)

蛋白种类	$\rho_{\text{超滤前}} /$ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$\rho_{\text{超滤液(1)}} /$ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$\rho_{\text{超滤液(2)}} /$ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$\rho_{\text{超滤液(3)}} /$ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$\bar{\rho}_{\text{超滤液}} /$ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	蛋白结合率/ %	蛋白结合率均值/ %
BSA	1.024 5	0.557 0	0.542 8	0.431 8	0.51 ± 0.069	50.17 ± 6.69	
	1.348 0	0.727 3	0.649 5	0.917 9	0.76 ± 0.14	43.26 ± 10.24	42.15 ± 8.63
	1.707 5	1.100 0	0.823 2	1.507 6	1.14 ± 0.34	33.02 ± 20.16	
HSA	1.024 5	0.535 2	0.547 3	0.705 2	0.60 ± 0.095	41.84 ± 9.26	
	1.348 0	0.888 9	0.899 1	0.767 3	0.85 ± 0.073	36.81 ± 5.44	40.67 ± 3.43
	1.707 5	0.811 9	0.795 9	1.293 8	0.97 ± 0.28	43.36 ± 16.57	
大鼠血清 蛋白	1.024 5	0.681 3	0.622 8	0.862 1	0.72 ± 0.12	29.52 ± 12.18	
	1.348 0	1.022 1	1.016 2	0.768 0	0.94 ± 0.15	30.61 ± 10.76	30.89 ± 1.52
	1.707 5	1.100 2	1.106 8	1.249 0	1.15 ± 0.084	32.53 ± 4.93	

注: $\rho_{\text{超滤液(1)}}$ 、 $\rho_{\text{超滤液(2)}}$ 、 $\rho_{\text{超滤液(3)}}$ 分别为 $\rho_{\text{超滤液}}$ 的第 1、2、3 次测量值

表 3 超滤法对蛋白结合率的影响

Table 3 Effect of ultrafiltration on protein binding rates

序号	加入量/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测得量/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/ %
1	0.409 8	0.424 8	103.66
2	0.409 8	0.461 6	112.64
3	0.409 8	0.454 8	110.98
4	0.819 6	0.820 5	100.11
5	0.819 6	0.814 0	99.32
6	0.819 6	0.816 1	99.57
7	1.639 2	1.614 4	98.49
8	1.639 2	1.625 3	99.15
9	1.639 2	1.625 9	99.19

平均回收率 = 102.57% $RSD = 1.73\%$

3 讨论

目前除特殊情况外,正辛醇已成为测定油水分配系数时公认的油相选择。因为正辛醇更接近生物相,其极性和溶解性能比其他惰性溶剂好,更能模拟药物在体内分配的过程。本实验亦选择正辛醇作为油相^[14]。

巴戟甲素是一种低聚糖类物质,具有糖类物质的理化性质,推测其亲水性应较大,难以分配进入正辛醇,故通过测定试验后水相中巴戟甲素含量可计算出其表观油水分配系数。虽然其 $\log p_{app} < 0$,提示亲水性更强,但巴戟甲素又属于小分子药物(相对分子质量为 342),故化合物的细胞膜通透性还有待于进一步考察。试验中还比较了巴戟甲素在水中

与在模拟人体肠液酸碱度环境(pH6.8的磷酸盐缓冲溶液)中的表观油水分配系数的差异,为其新药开发时给药剂型的设计提供基础。

巴戟甲素与大鼠血清蛋白的结合率低于其与 BSA 和 HSA 的结合率,后者主要组成均为白蛋白,因此推测这可能是巴戟甲素主要与血清中的白蛋白结合,与其他蛋白如酸性糖蛋白、脂蛋白等的结合率较小导致。试验结果显示巴戟甲素与大鼠血清蛋白结合率较低,因此进入血液后多以游离型分子状态存在,能透过生物膜进入到相应的组织或靶器官产生效应或进行代谢与排泄。但巴戟甲素蛋白结合率与其生物活性的关联,还需充分考虑到更多因素,如治疗剂量、内在清除率、分布容积、给药方式、药动-药效平衡时间等的影响,故在后续的药效学研究及新药开发中应进一步试验予以确证。

为考察巴戟甲素血清蛋白结合率是否存在质量浓度依赖性,试验中与每种蛋白的结合均设立了高、中、低 3 个质量浓度组,每个质量浓度重复试验 3 次,保证了试验结果具有统计学上的意义。试验数据显示,巴戟甲素血清蛋白结合率与其质量浓度无关。

超滤法主要是利用不同分子量截留值的多孔超滤膜截留大分子蛋白质,从而起到样品纯化的作用。由于含血清样品中可能存在的其他杂质及蛋白会降低膜的截留性能,因此,为考察超滤管对试验结果的影响,本文参考 2010 年版《中国药典》一部附录 X VIII [中药质量标准分析方法验证指导原则]项下“准确度”的要求^[15],采用加样回收法验证蛋白结合率操作方法的准确性。结果表明,本试验选用超滤法

除去样品溶液中蛋白质等大分子量杂质的纯化方法可行,不影响巴戟甲素分离,保证了测定结果的准确性。

参考文献:

- [1] 林励. 化合物-巴戟甲素及其制法和用途: 中国, ZL03139998.3 [P]. 2004-04-07 [2010-11-08].
- [2] 陈洁文, 王勇, 谭宝璇, 等. 巴戟素补肾健脑作用的神经活动基础[J]. 广州中医药大学学报, 1999, 16(4): 314-317.
- [3] 谭宝璇, 陈朝凤, 陈洁文, 等. 巴戟素补肾抗衰老的作用机制研究[J]. 新中医, 2000, 32(11): 36-38.
- [4] 谭宝璇, 苏文, 陈洁文, 等. 巴戟素对衰老大鼠空间学习记忆力的改善作用[J]. 中药新药与临床药理, 2000, 11(2): 95-97.
- [5] 梁宏宇, 吴伟, 陈宏圭. 巴戟素治疗血管性痴呆改善语言功能的初步探索[J]. 现代康复, 2001, 5(11): 29-30.
- [6] 杨黎辉. 巴戟素改善脑缺血再灌注损伤作用的实验研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2005.
- [7] 林芳花, 林励, 肖凤霞, 等. 巴戟甲素对正常雄性小鼠交配能力和免疫器官系数的影响[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(22): 1924-1926.
- [8] 肖凤霞, 林励. 巴戟天补肾壮阳作用的初步研究[J]. 食品与药品, 2006, 8(5): 45-46.
- [9] 梁文权. 生物药剂学与药物动力学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 56.
- [10] L. 夏盖尔, 吴幼玲, 余炳灼. 应用生物药剂学与药物动力学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 165.
- [11] 景春杰, 陈晓辉, 刘璇, 等. 丹酚酸 B 与小鼠血浆蛋白结合率的测定[J]. 药学学报, 2010, 45(3): 343-346.
- [12] 叶勇, 周莉玲, 晏亦林, 等. 超滤法测定磷酸川芎嗪的血浆蛋白结合率[J]. 中药材, 2010, 33(8): 1282-1285.
- [13] 王霄旻, 谢人明, 孙文基. 朝藿定 C 平衡溶解度和表观油水分配系数的测定[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(8): 1432-1434.
- [14] 张倩怡, 杜守颖, 陆洋, 等. 栀子提取物中栀子苷油水分配系数及大鼠肠吸收动力学研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(14): 1840-1844.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 130.

(责任编辑: 刘晓涵)

美国 FDA 警告慎用特布他林治疗早产

美国 FDA 于 2011 年 2 月 17 日发出警告, 要求谨慎使用注射或者长时间静脉滴注(48~72 h)的方式使用特布他林用于孕妇预防或治疗早产, 原因是该产品可能会引起孕妇产生严重的心脏疾病甚至死亡。此外, 口服特布他林片剂也不能用于孕妇预防或治疗早产。FDA 要求生产厂商尽快对产品的标签和说明书进行更新, 以加入以上信息。

特布他林是 FDA 已经批准的一种药物, 目前市面上有多种特布他林口服片剂和注射剂。它主要用于治疗哮喘病、支气管炎、肺气肿, 其发挥作用的机制主要是预防和治疗以上疾病患者的气道变窄(支气管痉挛)。但在临床中该药也被用于产科目的(虽然其适用症中并不包括这一方面), 如治疗早产和尿道过度刺激征等。据报道曾有孕妇因服用特布他林而死亡。

FDA 认为医院在某些紧急情况下对孕妇注射使用特布他林可理解, 但 FDA 对长时间(超过 48~72 h)注射使用特布他林表示关切, 并且明确反对让孕妇口服特布他林来预防或治疗早产。

FDA 根据药品售后安全报告及文献综述发出以上警告。据了解, 美国妇产科学会也不赞成使用特布他林预防早产。

(来源: 美国 FDA 新闻稿 2011-02-17 夏训明编译)