

HPLC-超滤法测定雷公藤红素与家兔、大鼠、人血浆的蛋白结合率

刘鹏*, 陈莹[#](中国医科大学附属第一医院, 沈阳 110001)

中图分类号 R969.1;R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)01-0062-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.01.20

摘要 目的:测定雷公藤红素在家兔、大鼠和人血浆中的血浆蛋白结合率。方法:采用高效液相色谱(HPLC)-超滤法分离测定游离药物和血浆蛋白结合药物。以高效液相色谱法测定离体大鼠、家兔和人血浆中雷公藤红素含量,计算血浆蛋白结合率。色谱柱为Diamondsil C₁₈,流动相为乙腈-0.2%甲酸(80:20, V/V),检测波长为425 nm,流速为1.0 ml/min,进样量为10 μl,柱温为40 ℃。结果:0.52、2.08、8.32 mg/L雷公藤红素在大鼠、家兔和人血浆中的检测质量浓度线性范围均为0.10~16.64 mg/L(*r*分别为0.999 5、0.999 6、0.999 5);血浆样品精密度的RSD均小于15%,在37、25、4 ℃下1 440 min内稳定性试验的RSD均小于5%。在0.52、2.08、8.32 mg/L质量浓度下雷公藤红素与人血浆的血浆蛋白结合率分别为84.62%、81.24%、83.14%,与大鼠的血浆蛋白结合率分别为79.44%、78.61%、78.15%,与家兔的血浆蛋白结合率分别为67.86%、68.71%、69.23%。结论:雷公藤红素的血浆蛋白结合率与其质量浓度无关;雷公藤红素与人的血浆蛋白结合率较高,其次为大鼠和家兔。

关键词 雷公藤红素;超滤法;高效液相色谱法;血浆蛋白结合率;体外试验

Determination of Plasma Protein Binding Rate of Celastrol in Rats, Rabbits and Human by HPLC-Ultrafiltration

LIU Peng, CHEN Ying (The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine the plasma protein binding rate of celastrol in rabbits, rats and human. METHODS: Ultrafiltration method was used to isolate and determine free drug and plasma protein binding substance. HPLC was employed to determine the plasma concentration of celastrol in rabbits, rats and human, and then on the basis of which plasma protein binding rates were calculated. The determination was performed on Diamondsil C₁₈ column with acetonitrile-0.2% formic acid (80:20, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 425 nm and the column temperature was 40 ℃. The sample size was 10 μl. RESULTS: The linear range of celastrol (0.52, 2.08, 8.32 mg/L) were 0.10-16.64 mg/L in plasma of rats, rabbits and human (*r*=0.999 5, 0.999 6, 0.999 5). RSD of the test was lower than 15%, and RSD of stability test was lower than 5% within 1 440 min at 37, 25 and 4 ℃. The plasma protein binding rates of celastrol (0.52, 2.08, 8.32 mg/L) in human were 84.62%, 81.24% and 83.14%, respectively; those were 79.44%, 78.61% and 78.15% in rats, while 67.86%, 68.71% and 69.23% in rabbits, respectively. CONCLUSIONS: The plasma protein binding rates of celastrol are not associated with drug concentration; those of celastrol in human are the highest, followed by in rats and in rabbits.

KEYWORDS Celastrol; Ultrafiltration; HPLC; Plasma protein binding rate; *in vitro* test

雷公藤红素(Celastrol)是卫矛科雷公藤属植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook f. 中提取的一种三萜类化合物,具有显著的抗炎、免疫抑制等药理活性,临床上用于皮肤病、风湿性关节炎、器官移植排斥的治疗^[1]。常用制剂有雷公藤糖浆、冲剂、片剂等,是治疗各类免疫亢进性疾病的首选药物。近年来,通过对雷公藤红素研究的不断深入,发现其对肿瘤的抑制作用不弱于紫杉醇,是一种新的蛋白酶抑制剂,对胃癌、肝癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌和胶质瘤等多种肿瘤细胞均呈现较好的抑制作用^[2]。虽然雷公藤红素抗肿瘤作用显著,但由于其水溶性差^[3],毒副作用较大^[4],口服给药可能会引起胃肠道刺激、肾毒性和心脏毒性,生物利用度低^[5]等,故其抗肿瘤作用在临床应用时受到限制。科研工作者进行雷公藤红素新型给药系统的研究来弥补雷公藤红素的自身理化性质和毒副作用缺陷^[6-7]。在药物制剂开发中的血浆蛋白结合率研究

对于设计安全评价方案和制订合理的给药方案具有重要意义,尤其对于毒性较大的雷公藤红素来说,在体内的血浆蛋白结合率变化可能引起药效和毒性的改变,更需要在研发和应用时引起注意。目前已有采用平衡透析法分离血浆并通过高效液相色谱(HPLC)法测定雷公藤红素血浆蛋白结合率的研究报道^[8]。平衡透析法是常用的血浆蛋白结合率测定前处理方法之一^[9-12]。相对而言,HPLC-超滤法测定血浆蛋白结合率具有快速简便的特点^[13-14],目前尚未有超滤法测定雷公藤红素血浆蛋白结合率的文献报道。本研究建立HPLC-超滤法快速测定雷公藤红素在人、大鼠和家兔离体血浆中的蛋白结合率,为雷公藤红素新型制剂的研发奠定实验基础。雷公藤红素的化学结构式见图1。

1 材料

1.1 仪器

1200型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);Allegra 64R型冷冻高速离心机(美国Beckman公司);KQ-250型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DSHZ-300型恒温水浴振荡器(江苏太仓实验设备有限公司);AL204型电子天平(瑞士

* 药师。研究方向:医院药学、新型药物制剂。电话:024-83282154

[#] 副教授,硕士。研究方向:医院药学、新型药物制剂。电话:024-83282489。E-mail: chy1982@aliyun.com

Mettler-Toledo 公司); XW-80A 型旋涡混合仪(上海医科大学仪器厂); Millipore 10K 型超滤管(美国 Millipore 公司)。

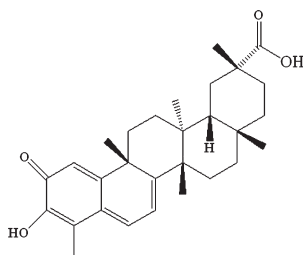


图1 雷公藤红素的化学结构式
Fig 1 Chemical structure of celastrol

1.2 药品与试剂

雷公藤红素(南京泽朗医药科技有限公司,批号:ZL2012AAS,含量:>98%);乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯)均购自美国 Merck 公司;水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

1.3 动物与血浆

健康 Wistar 大鼠,♂,体质量 200~250 g,由中国医科大学实验动物中心提供[实验动物使用合格证号:SYXK(辽)2008-0005];健康日本大耳白家兔,♂,体质量 2.0~2.5 kg,由沈阳药科大学实验动物中心提供[实验动物使用合格证号:SCXK(辽)2009-0002]。

新鲜大鼠血浆和家兔血浆(临用前笔者自制);健康人血浆(中国医科大学附属第一医院,4℃贮藏)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Diamondsil C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.2%甲酸(80:20,V/V),流速:1.0 ml/min;检测波长:425 nm;进样量:10 μl;柱温:40℃。按雷公藤红素色谱峰理论板数不低于 2 500。在此条件下分析大鼠空白血浆、雷公藤红素对照品、大鼠血浆样品,雷公藤红素的保留时间约为 8.4 min,血浆中并无其他成分干扰雷公藤红素的测定,色谱见图 2。

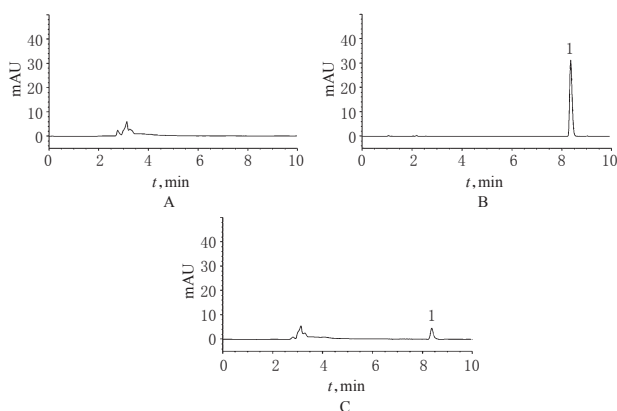


图2 高效液相色谱图

A. 空白血浆; B. 雷公藤红素对照品; C. 大鼠血浆样品; 1. 雷公藤红素

Fig 2 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. celastrol standard substance; C. rat's plasma sample; 1. celastrol

2.2 血浆样品的处理

取 Wistar 大鼠断头采血、日本大耳白家兔心脏取血,另取

健康人全血分别置于以肝素钠溶液涂抹过的离心管中,在(20±5)℃下,以离心半径 10.8 cm、3 000 r/min 离心 10 min,分离不同种属血浆,冷冻保存。

取各新鲜血浆分别加入适量雷公藤红素对照品溶液,涡旋混匀,制备成含有不同质量浓度的雷公藤红素血浆样品,在恒温振荡器中 37℃ 温育 2 h。将 500 μl 血浆样品装入 Millipore 10 K 超滤管中,以离心半径 10.8 cm、12 000 r/min 离心 15 min 制备超滤液,超滤液通过固相萃取小柱洗脱,洗脱液待分析测定。

2.3 对照品贮备液的制备

精密称取 10.4 mg 雷公藤红素对照品以甲醇溶解并定容至 10 ml,制备成质量浓度为 1.04 mg/ml 的雷公藤红素对照品贮备液,4℃贮藏。

2.4 样品的前处理

2.4.1 固相萃取小柱的活化。以 2 ml 甲醇活化 ProElut C₁₈ SPE 小柱,待甲醇自然通过小柱后,再加入 2 ml 水平衡小柱,注意保持勿干涸,备用。

2.4.2 超滤液处理。取 200 μl 超滤液进行固相萃取前处理,上样,待超滤液完全通过固相萃取小柱后加入水冲洗 1 ml,控制水通过小柱的速度不超过 3 ml/min,洗脱液弃去,小柱加压吹干;再以甲醇 1 ml 洗脱,速度同前,收集甲醇洗脱液置于 37℃ 氮气流下吹干,加入乙腈-水(80:20,V/V)200 μl 涡旋溶解得到样品液。

2.5 标准曲线的制备

在不同血浆中加入适量雷公藤红素对照品贮备液制成质量浓度为 0.10、0.52、2.08、4.16、8.32、16.64 mg/L 的对照品溶液,按“2.2”“2.4”项下方法处理,按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。以雷公藤红素峰面积(A)为横坐标、质量浓度(c)为纵坐标进行线性回归。结果表明,不同种属血浆中雷公藤红素质量浓度在 0.10~16.64 mg/L 范围内与峰面积呈良好线性关系,定量下限为 0.02 mg/L。回归方程与线性范围见表 1。

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear range

血浆种属	标准曲线	r	线性范围,mg/L
家兔血浆	$c=0.0112A-0.0235$	0.9995	0.10~16.64
大鼠血浆	$c=0.0109A-0.0917$	0.9996	0.10~16.64
人血浆	$c=0.0113A-0.1328$	0.9995	0.10~16.64

2.6 精密度试验

制备高、中、低 3 个不同质量浓度、不同种属的雷公藤红素对照品血浆溶液(其中含雷公藤红素质量浓度分别为 0.52、2.08、8.32 mg/L),按“2.2”“2.4”项下方法处理后,同日内进样 6 次测定日内精密度,连续进样 3 d 测定日间精密度。结果表明,血浆中雷公藤红素精密度的 RSD 均小于 15%。

2.7 回收率试验

2.7.1 提取回收率。精密吸取空白血浆 500 μl,按“2.5”项下方法制备低、中、高 3 个质量浓度的不同种属的含药血浆(雷公藤红素质量浓度分别为 0.52、2.08、8.32 mg/L),按“2.2”“2.4”项下方法处理后,测定雷公藤红素的含量,计算提取回收率。结果表明,该方法提取回收率较高,适用于生物样品中雷公藤红素的测定。提取回收率试验结果见表 2。

2.7.2 方法回收率。制备高、中、低 3 个不同质量浓度的不同

种属的全药血浆(雷公藤红素质量浓度分别为0.52、2.08、8.32 mg/L),依据“2.2”“2.4”项下方法处理后,测定雷公藤红素的含量,计算方法回收率。方法回收率试验结果见表3。

表2 提取回收率试验结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

血浆种属	提取回收率, %		
	高质量浓度	中质量浓度	低质量浓度
家兔血浆	99.7 ± 0.1	99.9 ± 0.6	97.9 ± 3.3
大鼠血浆	99.8 ± 0.1	99.2 ± 0.9	97.5 ± 3.8
人血浆	99.7 ± 0.1	99.7 ± 0.7	98.2 ± 2.6

表3 方法回收率试验结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

血浆种属	方法回收率, %		
	高质量浓度	中质量浓度	低质量浓度
家兔血浆	99.3 ± 3.3	102.6 ± 4.7	96.9 ± 3.4
大鼠血浆	97.8 ± 3.8	98.2 ± 3.6	98.7 ± 4.9
人血浆	99.2 ± 4.6	101.4 ± 5.2	96.8 ± 5.6

2.8 稳定性试验

精密吸取不同种属空白血浆1 ml,加入不同质量浓度的雷公藤红素对照品,使其血药浓度分别为0.52、2.08、8.32 mg/L,分别将3种质量浓度样品放置于37、25、4℃条件下0、60、120、240、480、720、1 440 min,按“2.2”“2.4”项下方法处理,进样测定,记录色谱图。结果表明,在37、25、4℃条件下1 440 min内雷公藤红素含量的RSD均不超过5%,血浆样品基本稳定。

2.9 血浆蛋白结合率试验

取不同种属的新鲜血浆分别加入适量雷公藤红素对照品溶液,涡旋混匀,制备成质量浓度为0.52、2.08、8.32 mg/L的雷公藤红素血浆样品,在恒温振荡器中37℃温育2 h。将500 μl血浆样品装入Millipore 10 K超滤管中,以离心半径10.8 cm、12 000 r/min离心15 min制备超滤液,测定游离的雷公藤红素含量,离心过程控制温度在4℃条件下。另外吸取200 μl的雷公藤红素血浆样品,按“2.4”项下方法前处理血浆样品液和超滤液,按上述色谱条件进样测定,记录色谱图,测定其中药物总量。计算血浆样品液和超滤液中雷公藤红素的含量,通过计算公式算出雷公藤红素与血浆蛋白的结合率:结合率(%)=[(超滤液中雷公藤红素含量/血浆中雷公藤红素总含量)×100%]。雷公藤红素与家兔、大鼠和人血浆的平均血浆蛋白结合率分别为68.6%、78.7%和83.0%。雷公藤红素与人血浆蛋白结合程度较高(>80%),而与大鼠和家兔血浆蛋白属于中等强度的结合。雷公藤红素在同种血浆中不同质量浓度的蛋白结合率差异无统计学意义($P>0.05$),说明在本研究的药物浓度范围内,雷公藤红素血浆蛋白结合率与药物质量浓度不相关。3种质量浓度雷公藤红素在不同种属血浆中的蛋白结合率见表4。

3 讨论

分离药物血浆蛋白有超滤法、平衡透析法、高效亲和色谱法和微透析法等。其中平衡透析法和超滤法较为常用,目前,尚无超滤法分离雷公藤红素血浆蛋白的文献报道。本研究参照文献方法采用可涵盖临床给药质量浓度范围的0.52、2.08、8.32 mg/L进行HPLC-超滤法测定不同种属血浆中雷公藤红素的蛋白结合率研究^[6,8,15],为雷公藤红素的制剂研发和临床应用提供依据。

表4 3种质量浓度雷公藤红素在不同种属血浆中的蛋白结合率($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 4 The protein binding rates of 3 kinds of concentrations of celastrol in different species of plasma($\bar{x} \pm s, n=6$)

血浆种属	蛋白结合率, %		
	低质量浓度	中质量浓度	高质量浓度
家兔血浆	67.86 ± 3.41	68.71 ± 4.84	69.23 ± 2.73
大鼠血浆	79.44 ± 1.25	78.61 ± 3.46	78.15 ± 4.21
人血浆	84.62 ± 3.15	81.24 ± 3.76	83.14 ± 2.54

依据超滤液体积与总体积之比的适宜范围在0.3~0.6的标准,同时考虑离心条件应不使蛋白漏过的前提条件,本研究进行了雷公藤红素和血浆蛋白结合的平衡时间和离心条件的考察。分别采用家兔、大鼠和人血浆,通过对不同时间点的取样分析,雷公藤红素血浆样品在37℃下温育2 h,与血浆蛋白可达到结合平衡点。

研究表明,雷公藤红素在3种血浆中,与人血浆蛋白呈结合强度最高,与大鼠和家兔血浆呈中等强度结合,雷公藤红素在人体内的游离药物浓度较低。一般情况下,药物进入体内发挥药理作用的是游离态的药物,雷公藤红素毒副作用较大,游离态雷公藤红素浓度的波动即会引起药效和毒副作用的变化,因此测定雷公藤红素的血浆蛋白结合率对其临床应用有重要意义。雷公藤红素的毒副反应明显,与人血浆蛋白结合率又属高强度结合,如果联合用药时与其他血浆蛋白结合率高的药物同时应用,要事先考虑二者对血浆蛋白结合位点的竞争可能导致雷公藤红素游离血药浓度迅速增加,进而可能导致严重的毒副作用,在联合应用前必须先进行相关研究方可合用。

本研究以HPLC-超滤法测定了不同质量浓度的雷公藤红素在家兔、大鼠和人血浆中的蛋白结合率,为雷公藤红素的抗肿瘤新型制剂研发和临床应用提供了实验依据。

参考文献

- [1] Kim DH, Shin EK, Kim YH, *et al.* Suppression of inflammatory responses by celastrol, a quinine methide triterpenoid isolated from *Celastrus regelii*[J]. *Eur Clin Invest*, 2009, 39(9):819.
- [2] 胡凯,葛卫红.雷公藤红素药理活性研究进展[J]. *亚太传统医药*, 2012, 8(11):179.
- [3] 陈铭祥,冯玉静,王定勇,等.雷公藤红素的研究进展[J]. *中成药*, 2010, 32(3):473.
- [4] 郭艳红,谭昱.雷公藤的毒性及其研究概况[J]. *中药材*, 2007, 30(1):112.
- [5] 夏玲红,崔岚.雷公藤红素的药理作用研究进展[J]. *医药导报*, 2009, 28(6):730.
- [6] 袁菱,周蕾,陈彦,等.雷公藤红素纳米结构脂质载体的制备及其体外透皮研究[J]. *中草药*, 2012, 43(8):1 514.
- [7] 夏海建,张振海,贾晓斌.雷公藤红素缓释滴丸的研究[J]. *中草药*, 2013, 44(7):834.
- [8] 袁菱,陈彦,周蕾,等.雷公藤红素在不同血浆中的蛋白结合率测定[J]. *中国医院药学杂志*, 2013, 33(3):175.
- [9] 任非,吴宗耀,段坤峰,等. HPLC法测定载叶马鞭草苷在不同血浆中的蛋白结合率[J]. *中国药房*, 2012, 23(35):

咪喹莫特乳膏的体外透皮吸收研究

於学良^{1*}, 张根元²(1.苏州卫生职业技术学院, 江苏 苏州 215009; 2.南京工业大学江苏省药物研究所有限公司, 南京 210009)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)01-0065-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.01.21

摘要 目的:建立测定咪喹莫特乳膏体外透皮吸收量的方法,并考察国产与进口制剂的体外透皮率。方法:采用体外扩散池法进行体外透皮试验,反相高效液相色谱法检测国产(3批)和进口(1批)咪喹莫特乳膏在37℃环境下透过离体小猪皮肤1、2、4、6、8、12、24 h的累积透皮率。色谱柱为Kromasil C₁₈,流动相为甲醇-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液-85%磷酸(48:52:0.2),流速为1.0 ml/min,检测波长为244 nm,进样量为50 μl。结果:咪喹莫特检测质量浓度的线性范围为0.01~2.0 μg/ml($r=0.999\ 2, n=6$),平均回收率为99.23%,RSD=0.51%($n=3$);国产和进口咪喹莫特乳膏的24 h体外累积透皮率均小于0.1%。结论:该方法操作简便、快速准确,可用于咪喹莫特乳膏的体外透皮研究。

关键词 咪喹莫特乳膏;反相高效液相色谱法;体外;透皮吸收

Study on Transdermal Absorption of Imiquimod Cream *in vitro*

YU Xue-liang¹, ZHANG Gen-yuan²(1.Suzhou Health College, Jiangsu Suzhou 215009, China; 2.Jiangsu Provincial Institute of Materia Medica, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the determination of transdermal amount of Imiquimod cream *in vitro*, and to investigate transdermal rate of domestic and imported preparation *in vitro*. METHODS: The transdermal experiment was conducted by diffusion cell *in vitro*, and accumulative penetration rates of domestic (3 batches) and imported Imiquimod cream (1 batch) at 37 °C through isolated skin of piggy within 1, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 h were determined by RP-HPLC. The determination was performed on Kromasil C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate-85% phosphoric acid (48:52:0.2) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 244 nm, and sample size was 50 μl. RESULTS: The linear range of imiquimod was 0.01-2.0 μg/ml ($r=0.999\ 2, n=6$) with average recovery rate of 99.23% (RSD=0.51%, $n=3$). 24 h accumulative penetration rates of domestic and imported Imiquimod cream all were lower than 0.1%. CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and accurate, and can be used for transdermal permeation study of Imiquimod cream.

KEYWORDS Imiquimod cream; RP-HPLC; *in vitro*; Transdermal absorption

咪喹莫特(Imiquimod)化学名称为1-异丁基-4-氨基-1*H*-咪唑并[4,5-*C*]喹啉,分子式为C₁₄H₁₆N₄,能够在用药局部诱导生成多种细胞因子及相关产物,产生免疫调节和间接抗病毒作用,临床上用于治疗成人外生殖器和肛门的疣/尖锐湿疣^[1]。咪

喹莫特在国内属于国家二类新药,主要剂型为乳膏剂。经查阅相关文献资料,未见报道咪喹莫特乳膏的透皮吸收研究。本文采用体外扩散池法,选用断奶1~10 d的小型猪背部皮肤模拟人体皮肤进行透皮吸收研究,以制剂中咪喹莫特透皮吸

.....

3 271.
[10] 高秀蓉,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):2 894.
[11] 苏琳,刘晨,李庆勇,等. 纳米喜树碱的蛋白结合率及其在血清中的稳定性研究[J]. 中国药房,2011,22(1):10.
[12] 黄勇,陈慧,何峰,等. 平衡透析法研究荜苈及其制剂的人血浆蛋白结合率[J]. 中国医院药学杂志,2012,32(21):

1 708.
[13] 陈莹,李月. 超滤法测定黄芩苷的血浆蛋白结合率[J]. 山西医药杂志,2010,39(7):677.
[14] 陈莹,蔡爽. 超滤法测定冬凌草甲素的血浆蛋白结合率[J]. 中国医药导报,2013,10(16):25.
[15] 薛云云,玛尔江·巴哈·提别克,王彦,等. 大鼠血浆中雷公藤红素的HPLC法测定[J]. 中国医药工业杂志,2011,42(7):532.

*副教授。研究方向:药物分析、药物化学。电话:0512-62690103。
E-mail: xlyu@szhct.edu.cn

(收稿日期:2014-02-06 修回日期:2014-04-19)
(编辑:张 静)