

# HPLC法测定胆酸类化合物与牛血清白蛋白的结合率<sup>Δ</sup>

张晓静<sup>1\*</sup>, 李丹丹<sup>1</sup>, 张俊义<sup>1</sup>, 孙毅坤<sup>2#</sup>(1.北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2.北京中医药大学, 北京 100102)

中图分类号 R969;Q512<sup>Δ</sup>.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)05-0413-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.05.10

**摘要** 目的:研究胆酸类化合物与牛血清白蛋白的结合率,为进一步了解胆酸类化合物体内蛋白结合特性提供依据。方法:采用平衡透析法,以磷酸盐缓冲溶液为透析液,透析内液中加入1 mmol/L牛血清白蛋白1 ml,透析外液中加入质量浓度分别为2.02、1.01、0.51 mg/ml的胆酸和猪脱氧胆酸,振荡30 h后,以高效液相色谱法测定透析袋两侧磷酸盐缓冲溶液中胆酸类化合物的质量浓度,并计算胆酸类化合物与牛血清白蛋白的结合率。结果:3种质量浓度下,胆酸与牛血清白蛋白的结合率分别为78.7%、78.2%、59.4%,猪脱氧胆酸与牛血清白蛋白的结合率分别为68.9%、76.2%、81.8%。结论:胆酸类化合物与牛血清白蛋白具有中等强度的结合率,胆酸类化合物在体内不易因游离浓度过大而产生副作用。

**关键词** 胆酸;猪脱氧胆酸;牛血清白蛋白;结合率;高效液相色谱法;平衡透析法

## Binding Rate of Cholic Acid Compound and Bovine Serum Albumin by HPLC

ZHANG Xiao-jing<sup>1</sup>, LI Dan-dan<sup>1</sup>, ZHANG Jun-yi<sup>1</sup>, SUN Yi-kun<sup>2</sup>(1.College of Chinese Pharmacy, Beijing University of TCM, Beijing 100102, China; 2.Beijing University of TCM, Beijing 100102, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the binding rate of cholic acid (CA) compounds and bovine serum albumin (BSA), and to provide reference for the further study of *in vivo* protein binding characteristics of CA compounds. METHODS: Using phosphate buffer (PBS) as dialysate, 1 mmol/L BSA 1 ml was added into intra-dialysate; and 2.02, 1.01 and 0.51 mg/ml CA and hyodesoxycholic acid (HDCA) were added into extra-dialysate in equilibrium dialysis. After oscillated for 30 h, HPLC was employed to determine the concentration of CA compounds in the PBS. The protein binding rates of CA compound and BSA were studied. RESULTS: Under the 3 kinds of concentrations, the binding rates of CA and BSA were 78.7%, 78.2%, 59.4%, respectively; the binding rates of HDCA and BSA were 68.9%, 76.2% and 81.8%, respectively. CONCLUSIONS: There is moderate intensive binding rate between CA compounds and BSA. There is no side effect due to free over-dose of CA compounds *in vivo*.

**KEYWORDS** Cholic acid; Hyodesoxycholic acid; Bovine serum albumin; Binding rate; HPLC; Equilibrium dialysis

胆汁酸在脂类物质的消化吸收和胆固醇代谢方面发挥着重要作用,胆酸(CA)作为人体胆汁中含量最丰富的胆汁酸,主要用作利胆药,因可治疗胆囊炎、胆汁缺乏、肠道消化不良等症而被广泛使用<sup>[1-2]</sup>。目前市场上已有胆酸钠片、猪脱氧胆酸(HDCA)片等胆酸类药物。药物作用的强弱与作用部位的药物浓度密切相关,当药物在体内各组织分布趋于动态平衡时,组织内药物化学势趋于一致,其转运速率遵循一定的规律。然而,血液中的药物有相当一部分可与蛋白结合,而结合形态的药物不能够参加转运并发挥药理作用;但结合态药物与游离态药物之间存在一个动态平衡,随着药物在体内代谢、排泄或组织内蓄积,与蛋白结合的药物可解离为游离态药物,在一定程度上达到维持血药浓度的作用<sup>[3-4]</sup>。因此,药物与蛋白的结合作用对于药物体内过程的研究有着重要的意义。近年来有关胆酸类化合物研究的文献报道很多<sup>[5-7]</sup>,但是针对胆酸类化合物与蛋白之间的相互作用却鲜有研究,而了解二者的相互作用有助于从分子水平上进一步了解胆酸类化合物体内蛋白结合特性,从而有助于设计和改造胆酸类药物分子以提高

药效和安全性,缩短作用时间,进而为胆酸类化合物的药理学、药动学、药理学以及毒理学方面提供重要依据和参考。本试验采用平衡透析法研究了胆酸类化合物与牛血清白蛋白(BSA)的结合率,为进一步开展胆酸类的相关研究提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);Alltech3300-蒸发光散射检测(ELSD)器(北京先明乐施科技发展有限公司);TGL-16G 高速离心机(上海安亭科学仪器有限公司);VORTEX GENIUS 3 旋涡混匀仪[莱贝(上海)科学仪器有限公司];MTN-2800D 型氮气吹干仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);DSHZ-300 多用途水浴恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂);pHS-W 型精密 pH 计(上海般特仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

胆酸对照品、猪脱氧胆酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100078-200414、100087-200610,均为含量测定用);BSA 标准品(北京拜尔迪生物技术有限公司,批号:C020102,纯度:98%);透析袋(北京拜尔迪生物技术有限公司);甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品贮备液:分别精密称取胆酸对照品、猪脱氧胆酸

Δ 基金项目:国家科技重大专项课题(No.2010ZX09502-002)

\* 硕士研究生。研究方向:中药体内代谢及质量控制。E-mail:zhxiji2012@163.com

# 通信作者:教授,博士。研究方向:中药体内代谢及质量控制。电话:010-84738619。E-mail:sunyik@163.com

对照品适量,置于10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得胆酸、猪脱氧胆酸的对照品贮备液,备用。

2.1.2 BSA溶液:取BSA标准品适量,精密称定,用磷酸盐缓冲溶液(PBS)溶解并稀释至刻度,制成浓度为1 mmol/L的BSA溶液。

2.1.3 透析液:取磷酸二氢钾2.72 g、氯化钠8.8 g,加0.1 mol/L氢氧化钠溶液适量,调节pH至7.4,补水至1 000 ml,即得浓度为0.02 mol/L的PBS(内含0.15 mol/L氯化钠),作为透析液。

## 2.2 色谱条件

色谱柱:Thermo-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.1%甲酸溶液(80:20),流速:1.0 ml/min;进样量:15 μl;ELSD检测器;漂移管温度:80 ℃;气体流速:2.0 L/min。分别进样胆酸的PBS溶液、胆酸的BSA溶液、透析袋内胆酸样品溶液、透析袋外胆酸样品溶液、猪脱氧胆酸的PBS溶液、猪脱氧胆酸的BSA溶液、透析袋内猪脱氧胆酸样品溶液、透析袋外猪脱氧胆酸样品溶液和透析液,记录色谱,见图1。

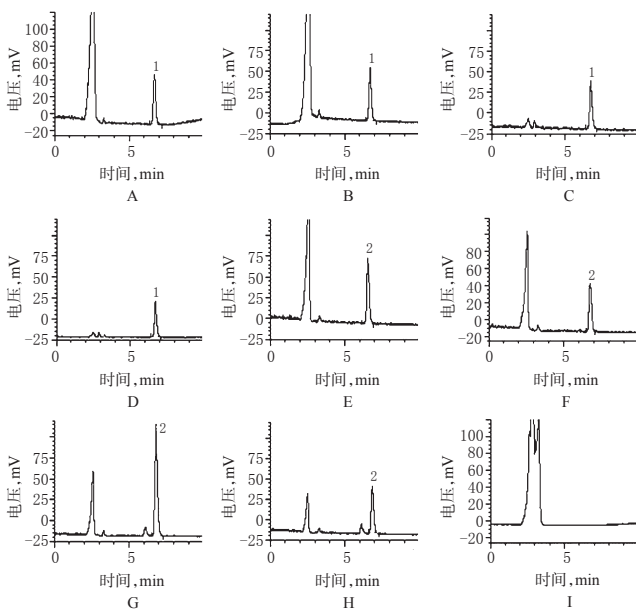


图1 胆酸类化合物的HPLC图

A.胆酸的PBS溶液;B.胆酸的BSA溶液;C.透析袋内胆酸样品溶液;D.透析袋外胆酸样品溶液;E.猪脱氧胆酸的PBS溶液;F.猪脱氧胆酸的BSA溶液;G.透析袋内猪脱氧胆酸样品溶液;H.透析袋外猪脱氧胆酸样品溶液;I.透析液;1.胆酸;2.猪脱氧胆酸

Fig 1 HPLC chromatograms of cholic acid compounds

A. PBS solution of CA; B. BSA solution of CA; C. sample solution of CA in dialysis bag; D. sample solution of CA out of dialysis bag; E. PBS solution of HDCA; F. BSA solution of HDCA; G. sample solution of HDCA in dialysis bag; H. sample solution of HDCA out of dialysis bag; I. dialysate; 1. CA; 2. HDCA

由图1可知,本试验中胆酸、猪脱氧胆酸的PBS溶液及BSA溶液的色谱图峰形良好,无杂质干扰测定,具有较高的特异性,分析条件可行。

## 2.3 样品处理

取样品溶液200 μl,加入0.1 mol/L盐酸溶液50 μl,加甲醇1 ml沉淀蛋白,旋涡混合30 s,以12 000 r/min(离心半径:8 cm)离心5 min,取上清液500 μl置于另一干燥聚乙烯塑料(PE)管中,氮气吹干,加200 μl甲醇复溶,即得。

## 2.4 线性关系考察

2.4.1 胆酸、猪脱氧胆酸在BSA溶液中的标准曲线:取胆酸对照品贮备液适量,用甲醇稀释成0.26、0.52、1.03、2.05、4.1 mg/ml系列对照品溶液;另取猪脱氧胆酸对照品贮备液适量,用甲醇稀释成0.30、0.59、1.18、2.36、4.72 mg/ml系列对照品溶液;再分别取200 μl BSA溶液各5份,分别加入上述不同质量浓度的胆酸、猪脱氧胆酸系列对照品溶液各100 μl,分别配成相当于含0.029、0.058、0.116、0.232、0.464 mg/ml胆酸及0.019、0.039、0.078、0.156、0.311 mg/ml猪脱氧胆酸的蛋白样品,按“2.3”项下方法处理后,进样分析,记录峰面积。以对照品质量浓度的对数值(x)为横坐标、峰面积的对数值(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为:胆酸 $y=0.986 2x+3.811 1$ ( $r=0.999 7$ ),猪脱氧胆酸 $y=1.080 6x+4.058 7$ ( $r=0.999 7$ )。结果二者检测质量浓度的线性范围分别为:胆酸0.029~0.464 mg/ml、猪脱氧胆酸0.019~0.311 mg/ml。

2.4.2 胆酸、猪脱氧胆酸在透析液中的标准曲线:分别取200 μl空白PBS各5份,加入“2.4.1”项下胆酸、猪脱氧胆酸系列对照品溶液各100 μl,分别配制成相当于含0.029、0.058、0.116、0.232、0.464 mg/ml胆酸及0.019、0.039、0.078、0.156、0.311 mg/ml猪脱氧胆酸的透析液样品,按“2.3”项下方法处理后,进样分析,记录峰面积。以对照品质量浓度的对数值(x)为横坐标、峰面积的对数值(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为:胆酸 $y=1.122 7x+3.869 7$ ( $r=0.999 7$ )、猪脱氧胆酸 $y=1.15x+4.204$ ( $r=0.999 8$ )。结果二者检测质量浓度的线性范围分别为:胆酸0.029~0.464 mg/ml、猪脱氧胆酸0.019~0.311 mg/ml。

## 2.5 回收率试验

分别在BSA溶液、透析液中加入质量浓度分别为胆酸0.51、1.025、2.05 mg/ml及猪脱氧胆酸0.59、1.18、2.36 mg/ml的对照品溶液,每种质量浓度平行6份,进样分析,计算回收率。结果3种质量浓度BSA溶液中胆酸的回收率分别为98.7%、97.7%、101.4%,RSD分别为2.7%、4.4%、1.6%( $n=6$ );3种质量浓度透析液中胆酸的回收率分别为104.8%、99.7%、101.6%,RSD分别为0.6%、4.6%、1.6%( $n=6$ )。在3种质量浓度BSA溶液中猪脱氧胆酸的回收率分别为98.8%、103.2%、99.9%,RSD分别为3.5%、1.3%、3.5%( $n=6$ );3种质量浓度透析液中猪脱氧胆酸的回收率分别为99.5%、101.3%、99.8%,RSD分别为3.8%、4.07%、5.4%( $n=6$ )。

## 2.6 精密度试验

2.6.1 日内精密度:取“2.4”项下含0.058、0.116、0.232 mg/ml胆酸及0.039、0.078、0.156 mg/ml猪脱氧胆酸的蛋白样品和透析液样品,每个样品同日内进样5次,考察日内精密度。结果胆酸在3种质量浓度蛋白样品中的RSD分别为1.66%、0.89%、1.07%( $n=5$ ),在3种质量浓度透析液样品中的RSD分别为1.70%、1.84%、1.68%( $n=5$ );猪脱氧胆酸在3种质量浓度蛋白样品中的RSD分别为0.06%、0.5%、0.5%( $n=5$ ),在3种质量浓度透析液样品中的RSD分别为0.2%、0.4%、1.0%( $n=5$ )。

2.6.2 日间精密度:取“2.4”项下含0.058、0.116、0.232 mg/ml胆酸及0.039、0.078、0.156 mg/ml猪脱氧胆酸的蛋白样品和透析液样品,每日进样测定5次,连续测定3 d,考察日间精密度。结果胆酸在3种质量浓度蛋白样品中的RSD分别为1.51%、1.85%、1.92%( $n=3$ ),在3种质量浓度透析液样品中的RSD分别为1.94%、1.82%、1.80%( $n=3$ );猪脱氧胆酸在3

种质量浓度蛋白样品中的RSD分别为1.7%、4.1%、3.9% ( $n=3$ ),在3种质量浓度透析液样品中的RSD分别为2.2%、3.2%、4.2% ( $n=3$ )。

### 2.7 稳定性试验

分别在BSA溶液、透析液中加入质量浓度为0.51、1.025、2.05 mg/ml胆酸及0.59、1.18、2.36 mg/ml猪脱氧胆酸的对照品溶液,制成蛋白样品和透析液样品,按“2.3”项下方法处理后,室温下保存,分别于0、2、6、10、16、30 h进样分析,记录峰面积。结果胆酸在3种质量浓度蛋白样品中的RSD分别为0.74%、0.61%、0.78% ( $n=6$ ),在3种质量浓度透析液样品中的RSD分别为0.64%、0.61%、0.32% ( $n=6$ );猪脱氧胆酸在3种质量浓度蛋白样品中的RSD分别为1.8%、1.2%、3.9% ( $n=6$ ),在3种质量浓度透析液样品中的RSD分别为1.5%、1.1%、3.3% ( $n=6$ )。表明样品在室温下放置30 h内稳定。

### 2.8 蛋白结合率的测定<sup>[8-9]</sup>

将管状透析袋一端用线结扎使不漏液,用移液管精密量取BSA溶液1 ml加入透析袋中,另一端折叠并用线结扎袋口,袋内保留少量空气,使透析袋能悬浮在透析液中。将透析袋置于盛有10 ml透析液的广口瓶中,调节袋内外液面高度,使保持同一水平。分别加入胆酸、猪脱氧胆酸对照品溶液适量,使透析外液的质量浓度均分别为0.51、1.01、2.02 mg/ml,最后用封口膜封住瓶口,每种质量浓度平行3份。于37℃恒温震荡30 h,到达平衡时间后,吸出袋外少量透析液,加等量10%高氯酸溶液,检查有无蛋白漏出。若袋外透析液变浑浊,则作废。取出透析袋,用滤纸吸干附着于袋外壁上的透析液,分别精密吸取袋内BSA溶液100  $\mu$ l、袋外透析液100  $\mu$ l作为蛋白样品,按“2.3”项下方法处理后,进样测定。按公式计算蛋白结合率,蛋白结合率=(袋内药物质量浓度-袋外药物质量浓度)/袋内药物质量浓度 $\times 100\%$ ,结果见表1。

表1 胆酸、猪脱氧胆酸与BSA的结合率测定结果

Tab 1 Binding rate results of CA or HDCA with bovine serum albumin

样品	质量浓度,mg/ml	蛋白结合率,%
胆酸	2.02	78.7
	1.01	78.2
	0.51	59.4
猪脱氧胆酸	2.02	68.9
	1.01	76.2
	0.51	81.0

### 2.9 平衡时间的确定

在透析袋内以1 ml透析液代替BSA溶液,透析袋外液中胆酸、猪脱氧胆酸的质量浓度分别为2.02、1.01、0.51 mg/ml,在9、18、30 h时测定二者在透析袋内、外的质量浓度,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30 h时袋内、外溶液中药物的质量浓度基本相等,表明扩散30 h已达到平衡,因此设定平衡透析时间为30 h。平衡时间的考察结果见表2。

### 2.10 药物在透析膜上的吸附

将透析袋内加入1 ml空白PBS,在透析袋外加入10 ml PBS及质量浓度为5.56、11.11、22.22 mg/ml的胆酸溶液或猪脱氧胆酸溶液各1 ml,每种质量浓度平行3份,当药物达到平衡后,测定透析袋外药物浓度。根据参考文献<sup>[10]</sup>计算3种质量浓度的胆酸、猪脱氧胆酸在透析膜上的吸附率分别为5.04%、3.54%、1.89%及6.53%、7.43%、5.04%,表明透析袋对胆酸及猪脱氧胆酸虽有微弱的吸附,该吸附量可忽略不计。

表2 平衡时间的考察结果( $n=3$ )

Tab 2 Results of equilibrium time( $n=3$ )

样品	质量浓度,mg/ml	透析袋内外浓度比值		
		9 h	18 h	30 h
胆酸	2.02	0.95	0.98	0.99
	1.01	0.95	0.97	0.99
	0.51	0.98	0.98	1.00
猪脱氧胆酸	2.02	0.80	0.87	1.02
	1.01	0.89	0.93	1.00
	0.51	0.90	0.95	0.99

## 3 讨论

平衡透析法的平衡温度一般可选在37℃或4℃恒温条件下测定。本试验采用37℃为温育温度以模拟正常人体体温。本试验中采用截留相对分子质量为3 500的透析膜进行试验,由高效液相色谱图可知,与透析液比较,透析袋外液的样品图谱基线较平稳,无明显杂质峰,表明蛋白中并无大量内源性物质从透析袋中渗出。此外,透析袋对药物的吸附微量,不影响测定结果,表明采用该型号的透析袋以平衡透析法测定胆酸类化合物的蛋白结合率是可行的。

本研究结果显示,高效液相色谱法测定胆酸与BSA结合率试验具有简便、快速、灵敏与选择性高的特点;且胆酸、猪脱氧胆酸与BSA具有中等强度的蛋白结合率,即为胆酸类小分子在体内被蛋白储存和转运提供条件的同时,胆酸类化合物在体内不易因游离浓度过大而产生副作用;在试验浓度范围内,蛋白结合率与透析液的药物浓度无关,同时,二者与蛋白的结合率没有明显差异。

## 参考文献

- [1] 尤承忠,汤文浩.胆汁酸合成及转运载体研究进展[J].国外医学消化系统分册,2004,24(1):52.
- [2] 张久聪,聂青和.胆汁酸代谢及相关进展[J].胃肠病学和肝病学杂志,2008,17(11):953.
- [3] 王志宇,苟国敬,王淑静,等.层状复合氢氧化物运载氟尿嘧啶与牛血清白蛋白结合率的检测[J].宁夏医科大学学报,2011,33(6):503.
- [4] 郭宾,李川.药物与血浆蛋白结合的药理学基础及其研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2005,10(3):241.
- [5] 魏锋,钟敏,尼加提,等.HPLC-ELSD法同时测定牛胆粉中3种胆酸类成分的含量[J].药物分析杂,2009,29(1):21.
- [6] 江英桥.HPLC-ELSD法测定清开灵注射液中胆酸和猪脱氧胆酸的含量[J].中国药品标准,2006,7(4):31.
- [7] Qiao X, Ye M, Pan DL, et al. Differentiation of various traditional chinese medicines derived from animal bile and gallstone: simultaneous determination of bile acids by liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2011, 1 218(1): 107.
- [8] 陈奇.中药药理研究方法学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:1 454-1 456.
- [9] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2005:708-709.
- [10] 卢来春,蒋学华,杨俊毅,等.阿莫西林对格列美脲血浆蛋白结合率的影响[J].华西药学杂志,2003,18(4):246.

(收稿日期:2013-09-09 修回日期:2013-10-12)