

大黄 5 个蒽醌类成分与大鼠血浆蛋白结合率的测定

冯素香^{1,2}, 吴加¹, 李建生¹, 屈凌波^{2,3*}, 徐会平², 杨冉², 李建军² (1.河南中医学院, 郑州 450008; 2.郑州大学, 郑州 450001; 3.河南工业大学, 郑州 450001)

摘要: 目的 建立测定大黄苷元中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 5 种成分与大鼠血浆蛋白结合率的方法。方法 采用体外平衡透析法, 模拟大黄苷元与血浆蛋白的结合过程, 以固相萃取柱处理血浆样品, 用高效液相色谱法测定大黄苷元中 5 种蒽醌类成分在透析袋内血浆中的浓度与透析袋外缓冲液中的浓度, 计算血浆蛋白结合率。结果 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚提取回收率分别为 68.6%, 91.5%, 78.6%, 88.2% 和 71.4%, 与大鼠体外血浆蛋白结合率分别为 93.1%, 91.3%, 95.2%, 87.5% 和 89.7%。结论 大黄 5 种苷元与大鼠血浆蛋白结合率较高, 且蛋白结合率与血药浓度无明显依赖性。

关键词: 大黄苷元; 血浆蛋白结合率; 平衡透析法; 高效液相色谱法

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)01-0001-05

Determination of the Binding Rate of Rat Plasma Protein with Five Anthraquinones in Rhubarb

FENG Suxiang^{1,2}, WU Jia¹, LI Jiansheng¹, QU Lingbo^{2,3*}, XU Huiping², YANG Ran², LI Jianjun² (1.Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 2.Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 3.Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a method for the simultaneous determination of the binding rate of plasma protein with aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol and physcion. **METHODS** The equilibrium dialysis method was carried out to imitate the binding process between five anthraquinones and plasma protein. Plasma samples were treated with solid-phase extraction and the binding rate was determined by HPLC. **RESULTS** The extract recoveries of aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol and physcion were 68.6%, 91.5%, 78.6%, 88.2% and 71.4%, the binding rates of plasma protein were 93.1%, 91.3%, 95.2%, 87.5% and 89.7%. **CONCLUSION** This method shows the high binding rate of five anthraquinones to plasma protein. The binding rates of five anthraquinones are not proportionally dependent on plasma concentration.

KEY WORDS: rhubarb aglycone; protein binding rate; equilibrium dialysis; HPLC

药物血浆蛋白结合率(binding rate of plasma protein, BRPP)是药动学的重要参数之一, 它直接影响到药物在动物体内的组织分布、代谢与排泄, 从而影响其作用强度和持续时间, 与药物的相互作用及作用机制等有非常密切的关系^[1]。更重要的是它与药物的药理作用强度密切相关, 尤其对毒性药物的临床应用具有极其重要的指导意义。有报道^[2]药物的药效学和药动学主要受与其结合蛋白的影响, 药物与蛋白结合率越高, 其半衰期也就越长。

大黄苷元为从中药大黄中提取的有效部位, 含有芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 5 种化学成分。现代药理研究表明, 大

黄苷元可以减轻大鼠脑缺血后脑组织损伤, 抗脑缺血损伤和抗血栓形成作用明显^[3-4]; 大黄苷元能减轻微血管基底膜胶原降解、降低血脑屏障通透性^[5]; 大黄苷元联合溶栓对微血管基底膜损伤具有保护作用, 可降低溶栓后的颅内出血率和死亡率, 并通过抑制细胞凋亡对大脑有保护作用^[6-7]。Liang 等^[8]用平衡透析法测定了大黄素的血浆蛋白结合率, 但未见大黄苷元其他 4 种成分与血浆蛋白结合率的研究。本实验采用平衡透析法首次研究了大黄苷元 5 种化学成分与大鼠血浆的蛋白结合率, 这为研究大黄 5 种蒽醌类成分与人血浆蛋白结合率奠定了方法学基础, 并为进一步研究大黄苷元在临

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81274179); 河南省高校青年骨干教师资助项目(2009GGJS-065); 河南省教育自然科学基金计划项目(2010A360002)

作者简介: 冯素香, 女, 博士, 副教授 Tel: (0371)65680562
博导 Tel: (0371)67756886 E-mail: qulingbo@zzu.edu.cn

E-mail: fengsx221@163.com *通信作者: 屈凌波, 男, 博士, 教授,

床治疗以及药物的药效学作用上奠定了基础。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪系统(Waters2695 Separations Module, Waters2996 Photodiode Array Detector Madein Singapore), Empower2 色谱工作站; KQ-100 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂制造); Sartorius BS210S 型电子天平; ZHWY-2101C 型恒温培养振荡器(上海智城分析仪器有限公司)。固相萃取柱(博纳艾杰尔科技有限公司); 透析袋(规格: EQ-D005, 孔径: 10 000 单位, 沈阳博克化工有限公司)。

芦荟大黄素对照品(批号: 110795-200805, 纯度 $\geq 98\%$)、大黄酸对照品(批号: 110757-200906, 纯度 $\geq 98\%$)、大黄素对照品(批号: 110756-200910, 纯度 $\geq 98\%$)、大黄酚对照品(批号: 110796-200716, 纯度 $\geq 98\%$)、大黄素甲醚对照品(批号: 110758-200610, 纯度 $\geq 98\%$)、1,8-二羟基蒽醌对照品(内标, 批号: 110829-9702, 纯度 $\geq 99\%$)均购自中国药品生物制品检定所; 甲醇(色谱醇, Fisher 公司); 乙腈(色谱醇, 天津市四友精密化学品有限公司); 氢氧化钠、磷酸二氢钠、磷酸、氯仿等试剂均为分析纯; 娃哈哈纯净水。

健康 SD(Sprague-Dawley)大鼠, δ , 体质量为(280 \pm 20)g, 河北省实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK(冀)2008-1-003。实验前禁食 24 h, 自由饮水。大鼠尾静脉取血, 肝素抗凝, 3 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 10 min, 分离血浆备用。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品储备液的配制 分别精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品适量, 加甲醇分别制成每 1 mL 含芦荟大黄素 5.56 μ g、大黄酸 3.90 μ g、大黄素 7.36 μ g、大黄酚 5.12 μ g、大黄素甲醚 5.92 μ g 的溶液, 作为对照品储备液, 4 $^{\circ}$ C 冷藏备用。

2.1.2 内标贮备液的配制 精密称取 1,8-二羟基蒽醌对照品, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成浓度为 1.6 μ g \cdot mL $^{-1}$ 的内标储备液, 4 $^{\circ}$ C 冷藏备用。

2.1.3 空白透析液配制 精密称取磷酸二氢钠 1.56 g, 加入氯化钠适量, 用 1 mol \cdot L $^{-1}$ 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.4, 加水至 500 mL, 即得 0.02 mol \cdot L $^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液(内含 0.15 mol \cdot L $^{-1}$ 的氯化钠)作为空白透析液。

2.2 色谱条件

色谱柱: Venusil XBP C₁₈(L)(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) (博纳艾杰尔科技有限公司); 流动相: 甲醇-0.1%磷酸水(73:27); 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 检测波长: 254 nm; 流速: 1 mL \cdot min $^{-1}$; 进样量: 20 μ L; 内标为 1,8-二羟基蒽醌。

2.3 标准曲线与线性范围

2.3.1 透析内液 取大鼠空白血浆 200 μ L, 分别加入一系列不同浓度的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品和相同浓度的 1,8-二羟基蒽醌标准品, 制得一系列浓度的血浆样品且每一溶液中 1,8-二羟基蒽醌的浓度均为 0.8 μ g \cdot mL $^{-1}$, 按“2.4”项下方法进行处理, 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 记录色谱峰的峰面积, 以对照品与内标的峰面积比值 Y 为纵坐标, 血药浓度 X 为横坐标, 绘制标准曲线并进行线性回归, 计算回归方程。

2.3.2 透析外液 取空白透析液 1 mL, 分别加入一系列不同浓度的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚和相同浓度的 1,8-二羟基蒽醌对照品溶液, 制得一系列空白透析液的模拟透析液样品且每一溶液中 1,8-二羟基蒽醌的浓度均为 0.8 μ g \cdot mL $^{-1}$, 按“2.4”项下方法进行处理, 以对照品与内标的峰面积比值 Y 为纵坐标, 血药浓度 X 为横坐标, 绘制标准曲线并计算回归方程。

透析内液和透析外液中 5 种蒽醌类成分的回归方程、相关系数和线性范围见表 1 和表 2。

表 1 透析内液中 5 种蒽醌类成分回归方程、相关系数和线性范围

Tab 1 Regression equation, correlation coefficient(r) and linearity range of anthraquinones in the dialysis membrane

蒽醌类成分	回归方程	相关系数(r)	线性范围/ μ g \cdot mL $^{-1}$	定量下限/ μ g \cdot mL $^{-1}$
芦荟大黄素	$Y=2.520 1X+0.105 3$	0.999 2	0.056 93~5.56	0.056 93
大黄酸	$Y=2.567 8X+0.041 2$	0.999 4	0.039 98~3.90	0.039 98
大黄素	$Y=2.473 3X+0.063 2$	0.999 1	0.075 37~7.36	0.075 37
大黄酚	$Y=2.810 7X+0.084 1$	0.997 9	0.052 40~5.12	0.052 40
大黄素甲醚	$Y=1.330 5X+0.052 7$	0.997 3	0.060 62~5.92	0.060 62

表 2 透析外液中 5 种蒽醌类成分回归方程、相关系数和线性范围

Tab 2 Regression equation, correlation coefficient(*r*) and linearity range of anthraquinones out the dialysis membrane

蒽醌类成分	回归方程	相关系数(<i>r</i>)	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	定量下限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
芦荟大黄素	$Y=2.883\ 7X+0.012\ 7$	0.998 9	0.012 44~1.990	0.012 44
大黄酸	$Y=3.268\ 4X+0.027\ 1$	0.999 2	0.019 75~3.160	0.019 75
大黄素	$Y=3.583\ 9X+0.048\ 2$	0.999 5	0.023 25~3.720	0.023 25
大黄酚	$Y=1.729\ 5X+0.013\ 6$	0.997 7	0.015 16~1.946	0.015 16
大黄素甲醚	$Y=2.637\ 5X+0.026\ 8$	0.998 1	0.029 60~4.736	0.029 60

2.4 样品预处理

分别取透析袋内外溶液各 500 μL 于离心管中, 加入 150 μL 内标溶液, 再加入 2 mL 的乙腈, 涡旋振荡 10 min, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 上清液用 4 倍量的 0.1% 的磷酸水稀释, 上活化好的 C_{18} 固相萃取柱内, 先用 2 mL 5% 的甲醇水除杂, 再 2 mL 乙腈洗脱, 洗脱液于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中, 空气吹干, 用 300 μL 甲醇定容进行分析。

2.5 专属性试验

芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚和内标 1,8-二羟基蒽醌的标准对照品、空白血浆、透析袋内溶液、空白缓冲溶液和透析袋外溶液的色谱图见图 1。结果 5 种成分的峰形良好, 且内源性成分不干扰 5 种成分的检测。

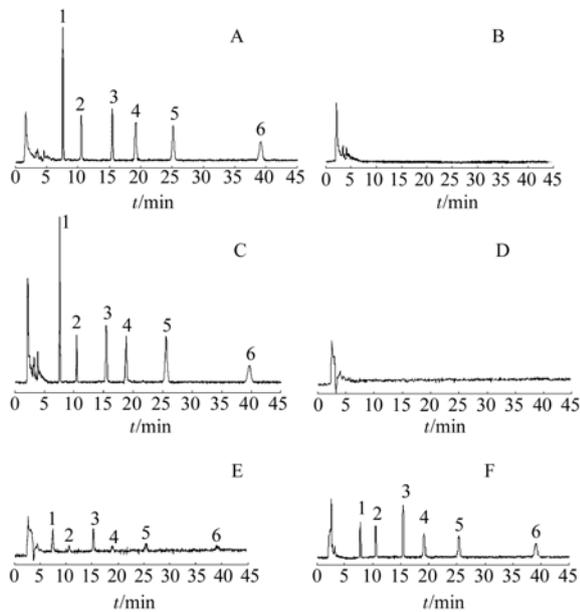


图 1 高效液相色谱图

A-空白血浆+混合对照品+内标; B-空白血浆; C-透析内液样品; D-空白透析液; E-透析外液样品; F-空白透析液+混合对照品+内标; 1-芦荟大黄素; 2-大黄酸; 3-1,8-二羟基蒽醌; 4-大黄素; 5-大黄酚; 6-大黄素甲醚

Fig 1 HPLC chromatograms

A-blank plasma spiked with mixed references and internal standard; B-blank plasma; C-the sample in the dialysis membrane; D-blank buffer solution; E-the sample out of the dialysis membrane; F-blank buffer solution spiked with mixed references and internal standard; 1-aloe-emodin; 2-rhein; 3-1,8-dihydroxy anthraquinone; 4-emodin; 5-chrysophanol; 6-phycion

2.6 精密度与准确度

2.6.1 透析内液 取空白血浆 500 μL , 置离心管中, 按“2.3”项下方法处理后测定, 配制成高、中、低 3 个浓度的模拟血浆样品, 每一浓度 5 样本分析, 计算回收率。以 1 d 内 6 次测得的浓度计算日内精密度, 以 1 周内连续 6 d 测定的浓度计算日间精密度, 计算相对标准偏差(RSD/%), 结果见表 3。

2.6.2 透析外液 取空白透析液 500 μL , 按“2.3”项下方法处理后测定, 配制成高、中、低 3 个浓度的模拟透析液样品, 每一浓度 5 样本分析, 计算回收率。以 1 d 内 5 次测得的浓度计算日内精密度; 以连续 6 d 内每天进样 1 次测定的浓度计算日间精密度, 计算相对标准偏差(RSD/%), 结果见表 4。

表 3 透析内液精密度与准确度测定结果($n=5$)

Tab 3 Accuracy and precision of the determination results in the dialysis membrane($n=5$)

蒽醌类成分	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	相对误差/%	RSD/%	
			日内精密度	日间精密度
芦荟大黄素	0.11	1.3	5.2	6.1
	1.26	2.9	3.6	4.3
	3.82	4.1	2.4	3.2
大黄酸	0.06	-1.9	4.6	6.1
	0.82	3.8	3.8	4.4
	1.92	2.7	2.9	3.2
大黄素	0.12	2.0	1.9	2.5
	2.34	1.9	3.7	4.7
	4.68	3.4	2.8	3.9
大黄酚	0.08	1.3	4.5	5.2
	1.20	1.8	3.4	4.9
	4.27	2.3	5.1	6.5
大黄素甲醚	0.12	-2.6	5.8	7.1
	1.26	-1.7	6.2	7.8
	3.92	-4.0	4.7	5.6

表 4 透析外液精密度与准确度测定结果

Tab 4 Accuracy and precision of the determination results out of the dialysis membrane

蒽醌类成分	浓度/ μg·mL ⁻¹	相对 误差/%	RSD/%	
			日内精密度	日间精密度
芦荟大黄素	0.05	5.2	7.6	8.4
	0.50	4.8	6.5	8.1
	1.02	5.6	5.8	7.1
大黄酸	0.05	-2.7	5.3	6.8
	0.62	-1.9	3.9	4.3
	2.26	-3.5	4.7	4.9
大黄素	0.06	6.4	3.7	5.2
	0.58	4.8	4.9	6.2
	2.86	5.9	3.2	3.8
大黄酚	0.05	2.6	6.2	6.9
	0.56	3.2	4.6	5.4
	1.20	4.1	5.2	6.1
大黄素甲醚	0.14	5.0	6.8	8.2
	1.08	5.7	8.1	8.6
	4.24	4.3	6.2	7.5

2.7 提取回收率与稳定性

精密吸取空白血浆 500 μL, 按“2.3”项下方法处理后测定, 配制成高、中、低 3 个浓度的模拟血浆样品, 每个浓度 5 样本分析, 以提取后的色谱峰面积与未经提取直接进样获得的峰面积之比, 考察样品的绝对提取回收率, 3 个浓度下大黄 5 种苷元芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的平均提取回收率分别为 68.6%, 91.5%, 78.6%, 88.2%和 71.4%, RSD 分别为 2.8%, 1.9%, 3.4%, 2.5%和 4.3%; 同样方法测定内标的平均提取回收率为 73.0%, RSD 为 4.82%。

精密吸取空白血浆 500 μL, 按“2.3”项下方法操作, 配制成高、中、低 3 个浓度的模拟血浆样品各 3 份。考察血浆样品室温放置 12 h 和-70℃下冷冻 1 周的稳定性。按“2.4”项下方法处理, 按“2.2”项下色谱条件进样, 记录所得芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚色谱峰的峰面积, 计算得到峰面积的平均 RSD 值, 结果见表 5。

表 5 血浆中大黄 5 种蒽醌类成分在不同条件下稳定性测定结果(n=3)

Tab 5 Stability of five anthraquinones in plasma under different storage conditions(n=3)

蒽醌类成分	浓度/ μg·mL ⁻¹	室温放置 12 h 的 RSD/%	-70℃下冷冻 1 周的 RSD/%
芦荟大黄素	0.035	3.8	7.6
	1.905	4.4	6.3
	3.775	3.4	4.9
大黄酸	0.029	5.9	5.7
	1.780	3.9	4.6
	3.530	5.2	5.6
大黄素	0.049	4.7	4.4
	2.795	6.1	5.3
	5.540	5.5	5.1
大黄酚	0.034	5.9	3.9
	1.783	4.8	4.2
	3.533	7.2	5.8
大黄素甲醚	0.045	5.5	4.5
	2.687	6.4	5.1
	5.328	5.7	5.9

稳定性考察结果表明, 3 个浓度血浆样品在室温放置 12 h 和-70℃下放置 1 周条件下稳定性良好。

2.8 蛋白结合率测定

将浸泡过的半透膜透析袋(长度约 10 cm)一段折叠, 结扎, 配制高、中、低 3 个不同浓度的大鼠新鲜含药血浆试液, 分别取 1.0 mL 放入透析袋中, 留一小段气泡, 多余空气排出, 并将其另一端折叠后, 扎紧, 放置悬浮于盛有 10 mL 透析液的试管中, 调节袋内外液体, 使其内外液面保持同一水平, 避免因液面高度差引起液体流动。除实验样本外, 另外用 1.0 mL 透析液代替血浆, 操作同上, 作为时间对照样本, 以确定袋外缓冲盐透析液自由扩散到袋内达到平衡所需的时间。每个浓度做 3 个平行样本。加入试药后, 将试管置于(37±1)℃水浴中, 持续振荡 48 h。达到平衡透析时间后, 吸出袋外透析液少许, 加等量高氯酸试剂, 以有无混浊现象检查透析外液有无血浆蛋白漏出。分别测定透析袋内血浆及袋外透析液中 5 种成分的大黄苷元中 5 种成分的浓度, 根据公式计算不同浓度组的血浆蛋白结合率: 蛋白结合率=(袋内血浆中药物浓度-袋外透析液中药物浓度)/袋内血浆中药物浓度×100%。根据测定袋内血浆及袋外透析液中 5 种大黄蒽醌类的浓度, 计算不同浓度组的血浆蛋白结合率。结果见表 5。

表 6 大黄 5 种蒽醌类成分血浆蛋白结合率测定结果($n=3$)
Tab 6 The plasma protein binding rate of the five anthraquinones($n=3$)

蒽醌成分	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	蛋白结合率/%	RSD/%
芦荟大黄素	0.205 6	91.8±0.87	0.95
	0.411 2	95.9±0.65	0.67
	0.822 4	91.6±0.19	0.20
大黄酸	0.231 2	89.5±1.60	1.80
	0.462 4	91.5±0.90	0.99
	0.924 8	92.9±1.20	1.30
大黄素	0.169 2	93.7±0.32	0.34
	0.338 4	95.2±0.33	0.35
	0.676 8	96.8±0.26	0.27
大黄酚	0.166 4	87.2±1.60	1.90
	0.332 8	85.5±0.16	0.19
	0.665 6	89.9±0.65	0.72
大黄素甲醚	0.232 0	87.5±0.81	0.93
	0.464 0	90.1±1.30	1.40
	0.928 0	91.3±0.59	0.65

大黄苷元的 5 种成分在高、中、低 3 个浓度上与大鼠血浆的平均蛋白结合率(%)分别为 93.1%, 91.3%, 95.2%, 87.5%和 89.7%, 属高等强度的蛋白结合率。

3 讨论

药物血浆蛋白结合率的研究方法主要有平衡透析法^[9]、超滤法^[10]、超速离心法、凝胶过滤法、微透析法^[11]等, 其中最常用的方法就是平衡透析法。药物与血浆蛋白的结合, 是药理学基础理论研究, 特别是分子药理学的重要研究内容之一^[12]。

本实验采用平衡透析法测定了不同浓度下 5 种大黄蒽醌类化合物的蛋白结合率, 经过对照样本实验发现, 48 h 内基本达到平衡, 选择平衡时间为 48 h。芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚在高、中、低 3 个血药质量浓度的血浆蛋白结合率呈现非浓度依赖性, 且结合率在 93.1%, 91.3%, 95.2%, 87.5%和 89.7%左右, 属高等强度的蛋白结合率。

本实验所建立的血浆和透析液样品固相萃取的预处理方法, 避免了液-液萃取较复杂的操作过程, 且具有较好的回收率和稳定性。在体内各种因素影响下大黄苷元与血浆的蛋白结合率会有所

的改变, 能引起药物的体内分布和消除的变化, 从而导致药效改变。本实验测定了高、中、低 3 个浓度下大黄苷元的 5 种成分与血浆蛋白的结合率, 为临床合理设计给药方案提供了依据。

REFERENCES

- [1] LIU R, XIE Y S, PAN G X, et al. Progress in research on methods for determination of the binding rate of drug [J]. Tianjin J Tradit Chin Med(天津中医药), 2007, 24(6): 526-528.
- [2] HALL L M, HALL L H, KIER L B. QSAR modeling of beta-lactam binding to human serum proteins [J]. J Comput Aided Mol Des, 2003, 17(2-4): 103-118
- [3] LI J S, LIU J X, FANG J, et al. Effects of glucoside and aglycone parts of rhubarb on the metabolism of free radicals in rats with ischemic brain injury [J]. Chin J Clin Rehabil(中国临床康复), 2004, 8(34): 7748-7750.
- [4] LI J S, LIU J X, FANG J, et al. Effects of rhubarb aglycone antagonising cerebral ischemic injury and influence on inflammatory factors in rats with cerebral ischemia [J]. Chin J Integr Tradit West Med Intensive Crit Care(中国中西医结合急救杂志), 2005, 12(5): 275-278.
- [5] LI J S, LIU J X, SUN J, et al. Effects of rhubarb aglycone on matrix metalloproteinase in cerebral ischemic tissue in rats with bone marrow mesenchymal stem cell transplantation [J]. J Chin Integ Med(中西医结合学报), 2008, 6(8): 810-816.
- [6] LI J S, LIU J X, WANG D, et al. Effects of rhubarb aglycone combined with thrombolysis is on brain microvascular basement membrane impairment in rats with thrombusoccluded cerebral ischemia [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2010, 35(21): 2908-2912
- [7] LIU J X, LI J S, WANG D, et al. Influence of rhubarb aglycone associated thrombolysis on neurocyte apoptosis in rats with thrombus-occluded cerebral ischemia [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2010, 16(9): 119-123
- [8] LIANG J W, HSIU S L, WU P P, et al. Emodin pharmacokinetics in rabbits [J]. Planta Med, 1995, 61(5): 406-408.
- [9] ERIKSSON M A, GABRIELSSON J, NILSSON L B. Studies of drug binding to plasma proteins using a variant of equilibrium dialysis [J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 38(1): 381-389.
- [10] TAYLOR S, HARKER A. Modification of the ultrafiltration technique to overcome solubility and non-specific binding challenges associated with the measurement of plasma protein binding of corticosteroids [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 41(1): 299-303.
- [11] TANG Y, ZHU H, ZHANG Y, et al. Determination of human plasma protein binding of baicalin by ultrafiltration and high-performance liquid chromatography [J]. Biomed Chromatogr, 2006, 20(10): 1116-1119.
- [12] TSAI T H. Assaying protein unbound drugs using microdialysis techniques [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 797(1/2): 161-173.

收稿日期: 2011-12-31