

# 丹参素、丹酚酸 B 与不同血浆蛋白结合率的测定

袁海建<sup>1\*</sup>, 安益强<sup>2</sup>, 陈宜刚<sup>1</sup>

(1. 泰州职业技术学院, 江苏 泰州 225300; 2. 徐州医学院, 江苏 徐州 221000)

**[摘要]** **目的:**建立测定丹酚酸 B 和丹参素与大鼠、牛血清白蛋白(BSA)、人血浆蛋白结合率的方法,比较丹酚酸 B 和丹参与不同血浆蛋白结合率的差异。**方法:**采用 UPLC 测定丹酚酸 B 和丹参素含量,流动相乙腈(A)-1%甲酸溶液(B)梯度洗脱(0~2 min,18% A;2~3 min,18%~30% A;3~6 min,30% A),检测波长 280 nm。通过平衡透析法考察丹酚酸 B 和丹参素与不同血浆的蛋白结合率。**结果:**丹酚酸 B 和丹参素在 3 种不同血浆中线性范围均为 2~200 mg·L<sup>-1</sup>,透析外液均为 0.5~20 mg·L<sup>-1</sup>。丹酚酸 B 在大鼠、人血浆和 BSA 中的平均血浆蛋白结合率分别为 90.60%,92.25%,87.55%;丹参素在大鼠、人血浆及 BSA 中的平均血浆蛋白结合率分别为 35.44%,37.71%,33.49%。**结论:**不同质量浓度的丹酚酸 B 和丹参素在同一种血浆中的蛋白结合率无显著性差异,丹酚酸 B 与 3 种血浆蛋白结合率较丹参素高。

**[关键词]** 丹酚酸 B; 丹参素; 血浆蛋白结合率; 平衡透析法; UPLC

**[中图分类号]** R945;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0136-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210136

## Determination of Protein Binding Rates of Salvianolic Acid B and Danshensu with Different Plasmas

YUAN Hai-jian<sup>1\*</sup>, AN Yi-qiang<sup>2</sup>, CHEN Yi-gang<sup>1</sup>

(1. Taizhou Polytechnic College, Taizhou 225300, China;

2. Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, China)

**[Abstract]** **Objective:** By establishing UPLC method for determining binding rate between salvianolic acid B, danshensu and rat, bovine serum albumin (BSA), human plasma proteins, to analysis difference of plasma protein binding rate of these two components. **Method:** UPLC method was employed to determine contents of salvianolic acid B and danshensu with mobile phase of acetonitrile (A) -1% formic acid solution (B) for gradient elution (0-2 min, 18% A; 2-3 min, 18%-30% A; 3-6 min, 30% A) and detection wavelength at 280 nm. Equilibrium dialysis method was used to investigate binding rates of salvianolic acid B and danshensu with different plasma proteins. **Result:** Linear ranges of salvianolic acid B and danshensu in 3 kinds of plasma were 2-200 mg·L<sup>-1</sup>, and in dialysis filtrates were 0.5-20 mg·L<sup>-1</sup>. Mean protein binding rates of salvianolic acid B in rat, human plasma and BSA were 90.60%, 92.25%, 87.55%, respectively; these of danshensu were 35.44%, 37.71%, 33.49%, respectively. **Conclusion:** Binding rates of different concentrations of salvianolic acid B and danshensu in the same plasma have no significant difference, but binding rates of salvianolic acid B with 3 kinds of plasma protein are higher than danshensu.

**[Key words]** salvianolic acid B; danshensu; plasma protein binding rate; equilibrium dialysis; UPLC

丹参为唇形科植物 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎,具有活血化瘀、理气开窍的作用<sup>[1]</sup>。

其主要水溶性成分为丹酚酸 B 和丹参素,二者临床常用于心绞痛、心肌梗死及脑血管疾病的预防和治

**[收稿日期]** 20140408(013)

**[基金项目]** 泰州职业技术学院“博硕基金”项目(TZYBS-12-7);江苏省大学生创新创业训练计划项目(201312106012Y)

**[通讯作者]** \*袁海建,讲师,从事中药新剂型与新技术研究,Tel:15850885701,E-mail:yuanjian8101@163.com

疗<sup>[2-3]</sup>。血浆蛋白结合率是药物体内评价的重要参数之一,影响着药物在体内的分布、排泄和代谢速率,对药物的消除半衰期亦有一定影响<sup>[4]</sup>。本实验采用平衡透析法,利用 UPLC 建立丹酚酸 B 和丹参素在不同血浆中的含量测定方法,考察丹酚酸 B 和丹参素在牛血清白蛋白、大鼠及人的空白血浆中蛋白结合率,为开展其体内代谢和药动力学研究提供参考。

## 1 材料

Acquity 型超高压液相色谱仪(美国 Waters 公司),M222718 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),5430R 型艾本德冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),OA-SYS 型氮吹仪(美国 Organomation Associates 公司),Milli-Q 型纯水制备系统(美国密理博公司)。丹参素、对羟基苯甲酸、丹酚酸 B 对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 20110704,20120508,20120321),牛血清白蛋白(瑞士罗氏公司,货号 738328),正常人空白血浆(徐州医学院附属医院),大鼠空白血浆[徐州医学院动物房,大鼠购自上海斯莱克实验动物中心,合格证号 SCXK(沪)2007-0005],MD25 透析袋(8~14 kDa,鼎国生物技术有限公司),乙腈为色谱纯,水为自制纯净水或去离子水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的配制

**2.1.1 空白透析液** 精密称取磷酸氢二钾 14.11 g,磷酸二氢钾 2.59 g,氯化钠 1.99 g,置于 1 L 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,得 pH 7.4 磷酸缓冲液。

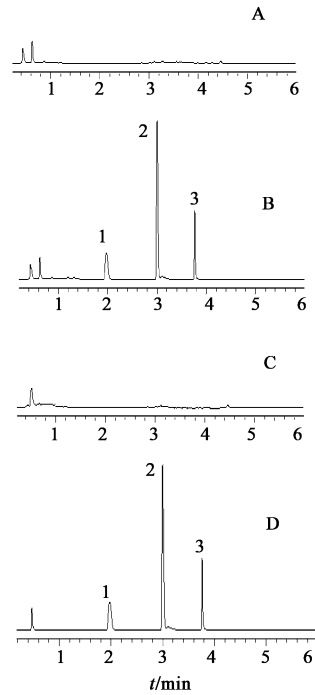
**2.1.2 丹酚酸 B 和丹参素系列溶液 I** 精密称定丹酚酸 B 和丹参素对照品各 10 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,各加水稀释成 4, 10, 20, 40, 200, 400 mg·L<sup>-1</sup> 的系列溶液,用于透析内液的方法学研究。

**2.1.3 丹酚酸 B 和丹参素系列溶液 II** 精密称定丹酚酸 B 和丹参素对照品各 2.0 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,各取适量用空白透析液稀释成 1, 2, 5, 10, 20, 50 mg·L<sup>-1</sup> 的系列溶液,用于透析外液的方法学研究。

**2.1.4 丹酚酸 B 和丹参素系列溶液 III** 精密称定丹酚酸 B 和丹参素各 5.0 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,各取适量用空白透析液稀释成 20, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup> 的系列溶液,用于蛋白结合率的研究。

**2.1.5 内标溶液** 精密称定对羟基苯甲酸对照品 2.0 mg 至 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,得 200 mg·L<sup>-1</sup> 内标溶液。

**2.2 色谱条件** BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.7 mm×50 mm, 1.7 μm),流动相乙腈(A)-1% 甲酸溶液(B)梯度洗脱(0~2 min, 18% A; 2~3 min, 18%~30% A; 3~6 min, 30% A),检测波长 280 nm,柱温 30 °C,流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 2 μL,见图 1。结果显示丹酚酸 B 和丹参素的峰形良好,无杂质峰干扰测定,具有良好的专属性,空白血浆、空白透析液在此条件下对测定无干扰。



A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 对照品;  
C. 空白透析液; D. 空白透析液 + 对照品;  
1. 丹参素; 2. 对羟基苯甲酸; 3. 丹酚酸 B

图 1 不同体内试液中丹酚酸 B 和丹参素 HPLC

**2.3 透析液样品的预处理** 精密量取血浆样品(透析内液)或透析外液样品 0.5 mL,置 10 mL 具塞离心管中,依次加入 pH 1 盐酸溶液 0.5 mL,内标溶液 50 μL 和乙酸乙酯 1 mL,涡旋混匀 1 min,于 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,将上层有机相转移至离心管中,室温下氮气吹干,加甲醇 0.5 mL 复溶,涡旋 1 min,于 13 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液,即得。

### 2.4 标准曲线绘制

**2.4.1 透析内液** 取空白血浆 0.5 mL,加入丹酚酸 B 和丹参素系列溶液 I 适量,配制成质量浓度分别为 2, 4, 10, 20, 100, 200 mg·L<sup>-1</sup> 的模拟透析内液生物样品,按 2.3 项下方法处理,以峰面积为纵坐标,血药浓度为横坐标,得回归方程。见表 1。

表 1 丹酚酸 B 和丹参素在不同血浆及透析外液中的标准曲线

成分	标准曲线	r	线性范围 /mg·L <sup>-1</sup>
丹酚酸 B	$Y_a = 20\ 512C + 17\ 851$	0.999 4	2 ~ 200
	$Y_b = 21\ 198C + 15\ 219$	0.999 3	2 ~ 200
	$Y_c = 23\ 367C + 13\ 726$	0.999 8	2 ~ 200
	$Y_d = 25\ 423C + 11\ 772$	0.999 6	0.5 ~ 20
丹参素	$Y_a = 16\ 275C + 361\ 793$	0.999 4	2 ~ 200
	$Y_b = 17\ 475C + 33\ 438$	0.999 6	2 ~ 200
	$Y_c = 19\ 146C + 36\ 924$	0.999 8	2 ~ 200
	$Y_d = 22\ 339C + 39\ 921$	0.999 8	0.5 ~ 20

注: a 为小鼠血浆, b 为牛血清白蛋白; c 为人血浆, d 为空白透析液。

**2.4.2 透析外液** 取空白透析液 0.5 mL, 加入丹酚酸 B 和丹参素系列溶液 II 适量, 配制成质量浓度分别为 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 mg·L<sup>-1</sup> 的模拟透析外液样品, 按 2.3 项下方法处理, 以峰面积为纵坐标, 血药浓度为横坐标, 得回归方程, 见表 1。

### 2.5 方法学考察

**2.5.1 透析内液精密度** 透析内液按 2.4.1 项下方法操作, 将丹酚酸 B 和丹参素用 3 种空白血浆分别配制成低、中、高 (1, 10, 50 mg·L<sup>-1</sup>) 质量浓度的模拟生物样品 (n = 5), 按 2.3 项下方法处理, 按 2.2 项下方法于 1 d 内连续测定 5 次, 连续测定 3 d, 计算日内和日间精密度的 RSD 均 < 5%。

**2.5.2 透析外液精密度** 透析外液按 2.4.2 项下方法操作, 将丹酚酸 B 和丹参素用空白透析液配成低、中、高 (0.5, 5, 20 mg·L<sup>-1</sup>) 质量浓度的溶液 (n = 5), 按 2.3 项下方法处理, 按 2.2 项下方法于 1 d 内连续测定 5 次, 连续测定 3 d, 计算日内和日间精密度的 RSD 均 < 5%。

**2.5.3 提取回收率** 按 2.4 项下方法操作, 配制高、中、低 3 个质量浓度的透析内液和透析外液溶液 (n = 5), 按 2.3 项下方法处理, 计算丹参素、丹酚酸 B 和内标物的提取回收率分别为 (79.68 ± 2.12)%, (81.12 ± 3.96)%, (80.67 ± 2.89)%。

**2.5.4 稳定性考察** 按 2.4 项下方法操作, 配制高、中、低 3 个质量浓度的丹酚酸 B 和丹参素血浆样品, 考察血浆样品预处理后室温放置 4 h 和 -70 °C 放置 1 周的稳定性, 计算二者峰面积的 RSD 均 < 2%, 表明血浆样品在室温下放置 4 h 和 -70 °C 放置 1 周时稳定性良好。

**2.6 平衡时间考察** 在透析袋内以空白透析液代替血浆, 透析外液中丹酚酸 B 和丹参素的质量浓度

分别为 1, 5, 10 mg·L<sup>-1</sup>, 进行平衡透析试验, 分别于 8, 12, 24, 32 h 结束试验, 按 2.3 项下方法处理, 按 2.2 项下色谱条件测定透析袋内、外丹酚酸 B 和丹参素质量浓度, 结果显示丹酚酸 B 和丹参素透析达平衡时间约 24 h。

**2.7 透析膜物理吸附考察**<sup>[5]</sup> 平衡透析试验时考察透析膜对药物的吸附作用, 计算低、中、高质量浓度 (1.0, 5.0, 10 mg·L<sup>-1</sup>) 的样品透析膜对丹酚酸 B 的吸附率分别为 (2.13 ± 0.56)%, (2.45 ± 0.37)%, (3.25 ± 0.29)%, 丹参素则依次为 (2.27 ± 0.83)%, (2.61 ± 0.72)%, (3.41 ± 0.35)%。结果表明透析膜存在微量吸附作用, 但对测定结果无显著影响, 提示透析膜对药物的物理吸附作用可忽略不计。

**2.8 平衡透析试验** 将预处理<sup>[6]</sup>好的透析袋在空白透析液中室温浸泡 24 h, 一端折叠用线扎紧, 除去袋内水分, 精密吸取空白血浆 2 mL 加入透析袋, 将透析袋另一端扎紧, 使其悬浮于盛有 20 mL 含药透析外液的带盖试剂瓶中, 调整透析袋高度, 使其内外液面保持同一水平并避免透析袋贴壁, 密封瓶口, 于 37 °C 恒温水浴中平衡透析 24 h, 透析结束时, 吸取透析外液, 加入等量 3% 三氯乙酸溶液检查是否有血浆蛋白漏出, 若有白色絮状物析出, 则该样品作废。无血浆蛋白漏出者, 分别取透析袋内、外样品测定药物浓度, 按  $(C_{内} - C_{外}) / C_{内} \times 100\%$  计算血浆蛋白结合率, 其中  $C_{内}$  为透析袋内血浆药物浓度,  $C_{外}$  为透析外液药物浓度, 见表 2。

运用 SPSS 11.5 软件对表 2 中数据进行分析, 结果表明不同质量浓度的丹酚酸 B 和丹参素在同一种血浆中, 血浆蛋白结合率无显著性差异; 丹酚酸 B 与小鼠、牛血清白蛋白和人血浆的蛋白结合率相互之间比较具有显著性差异; 丹参素与小鼠、牛血清白蛋白和人血浆的蛋白结合率相互之间比较亦具有显著性差异。

### 3 讨论

本文通过平衡透析法结合 UPLC 测定不同质量浓度下丹酚酸 B 和丹参素在小鼠、牛血清白蛋白和人血浆中的蛋白结合率。平衡透析法是基于药物与血浆蛋白结合的原理<sup>[7]</sup>, 操作简单、方便, 可测定处于平衡状态下游离药物的质量浓度。由于丹酚酸 B 和丹参素极性相差较大, 洗脱流动相极性相差较大, 需梯度洗脱程序, 若采用 HPLC, 基线漂移严重, 分析时间长; UPLC 具有响应值高、检测限低、分析时间短等特点, 测试在 6 min 内即可完成, 大大缩短了分析时间, 且基线较平稳。

表 2 丹酚酸 B 和丹参素在 3 种不同血浆中的蛋白结合率( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

样品	血浆	蛋白结合率/%		
		50 mg·L <sup>-1</sup>	100 mg·L <sup>-1</sup>	200 mg·L <sup>-1</sup>
丹酚酸 B	大鼠	89.26 ± 0.39	90.89 ± 0.25	91.65 ± 0.52
	牛血清白蛋白	86.67 ± 0.24	87.37 ± 0.49	88.62 ± 0.81
	人	91.12 ± 0.32	92.28 ± 0.15	93.35 ± 0.21
丹参素	大鼠	34.26 ± 0.44	34.96 ± 0.57	37.10 ± 0.69
	牛血清白蛋白	32.15 ± 0.76	33.36 ± 0.51	34.95 ± 0.31
	人	36.17 ± 0.36	37.73 ± 0.27	39.22 ± 0.12

试验结果表明丹酚酸 B 的血浆蛋白结合率较高,在血浆中大部分呈结合状态;丹参素的血浆蛋白结合率较低,在血浆中大部分呈游离状态。丹参注射剂中多含有丹酚酸 B 和丹参素,二者与血浆蛋白结合能力的差异会直接影响到该制剂在血液中游离态的浓度。体内药物是以游离态分子从血液向组织转运,药物的分布、代谢、排泄及与相应受体结合继而发生药理效应都以游离形式进行<sup>[8]</sup>。因此在使用丹参注射剂时,应注意由于丹酚酸 B 和丹参素蛋白结合率差异而造成的药效差异问题,与其他制剂应用时,还需考察药物间相互竞争作用。

#### [参考文献]

- [1] 罗彩莲. 丹参的药理作用与临床应用[J]. 中国当代医药, 2012, 19(12): 11.
- [2] 张莉, 张维库, 赵莹, 等. 丹酚酸 A 的研究与进展[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(19): 2603.
- [3] Wu W Y, Wang Y P. Pharmacological actions and therapeutic applications of *Salvia miltiorrhiza* deposite salt and its active components[J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 33(9): 1119.
- [4] 景春杰, 陈晓辉, 刘璇, 等. 丹酚酸 B 与大鼠血浆蛋白结合率的测定[J]. 药学报, 2010, 45(3): 343.
- [5] 李敏, 王春英, 景秀娟, 等. 高效液相色谱法测定间尼索地平不同对应体在血浆中的蛋白结合率[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(3): 181.
- [6] 童成亮, 吴小英. 牡荆素血浆蛋白结合率的测定[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(14): 2168.
- [7] 曹伟, 陈彦, 袁菱, 等. 华蟾酥毒基和酯蟾毒配基与不同血浆蛋白结合率的测定[J]. 药学报, 2012, 47(9): 1200.
- [8] 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, 2009: 106.

[责任编辑 刘德文]

## 《中国当代医药》杂志 欢迎投稿 欢迎订阅

《中国当代医药》杂志是国家卫生和计划生育委员会主管, 中国保健协会、当代创新(北京)医药科学研究院主办的医药卫生专业期刊, 本刊已被美国化学文摘(CA)数据库、万方数据数字化期刊群、中国核心期刊(遴选)数据库、中国知网、中国学术期刊网络出版总库、中文科技期刊数据库全文收录, 系中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊。现为旬刊, 国内刊号: CN11-5786/R, 国际刊号: ISSN 1674-4721, 邮发代号: 2-515, 定价: 每期 20 元, 通过本刊发行部订阅全年 36 期杂志优惠价为 540 元。

主要栏目: 综述、论著、实验研究、临床研究、药理与毒理、药品鉴定、药物与临床、新药评价、麻醉与镇痛、医学检验、病理分析、影像与介入、中医中药、护理研究、制剂与技术、医药教育、调查研究、工作探讨等 50 多个栏目。根据全国继续医学教育委员会的《继续医学教育学分授予与管理办法》学分授予标准, 在本刊发表的论文可获得国家级继续教育学分。本刊出版周期短, 来稿无论录用与否均在短期内告知作者。对省、部级以上部门立项的科研论文以及本刊订户的论文予以优先刊登。本刊订户凭订阅单复印件投稿, 同等条件优先录用。欢迎各医药单位、院校、厂家刊登广告。

社址: 北京市朝阳区惠家胡同润园(壹线国际)5-3-602 邮编: 100025

投稿热线: 010-59679076 59679077 发行热线: 010-59679533 传真: 010-59679056

投稿邮箱: ddy@vip.163.com 网址: www.dangdaiyiyao.com