

# 超滤法测定丹酚酸 A 的血浆蛋白结合率

陈豆, 涂星, 张英丰\*

(广州中医药大学, 广州 510006)

**[摘要]** **目的:** 建立血浆样品中丹酚酸 A 浓度的分析方法, 并测定丹酚酸 A 的血浆蛋白结合率, 为进一步展开丹酚酸 A 的代谢和药动学研究及指导临床用药提供参考。**方法:** 采用超滤法和 HPLC 测定丹酚酸 A 在牛血清白蛋白(BSA), 大鼠血浆, 新西兰兔血浆和比格犬血浆中的蛋白结合率。**结果:** 丹酚酸 A 在  $0.01 \sim 2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  线性良好, 标准曲线方程为  $Y = 0.8073X + 0.0132$  ( $r = 0.9994$ )。丹酚酸 A 与 BSA, 大鼠血浆, 新西兰兔血浆和比格犬血浆在  $5.0, 50.0, 100.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的含药血浆中其平均蛋白结合率分别为  $(99.79 \pm 0.02)\%$ ,  $(99.79 \pm 0.03)\%$ ,  $(99.73 \pm 0.06)\%$ ,  $(99.81 \pm 0.03)\%$ 。**结论:** 所建立的方法灵敏度高, 专属性 and 重复性好, 操作简单, 能够满足定量分析测试要求。丹酚酸 A 与血浆蛋白有很强的结合, 且在已考察的血药浓度范围内其血浆蛋白结合率无明显浓度依赖性和种属差异性。

**[关键词]** 丹酚酸 A; 血浆蛋白结合率; 超滤法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0077-04

## Determination of Plasma Protein Binding Rate of Salvianol Acid A by Ultrafiltration

CHEN Dou, TU Xing, ZHANG Ying-feng\*

(Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for the determination of salvianolic acid A in the plasma samples, and then study the plasma protein binding rate of salvianolic acid A. This can provide a reference to the further study of salvianol acid A in its metabolism, pharmacokinetics and clinical treatment. **Method:** The ultrafiltration was employed to determine the plasma protein binding rate of salvianol acid A in BSA plasma samples, rat plasma samples, the New Zealand rabbit plasma samples and beagle dog plasma samples. The plasma concentrations of salvianol acid A were measured by RP-HPLC. **Result:** The calibration curve of salvianolic acid A was linear within the ranges of  $0.01 \sim 2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $r = 0.9994$ ). The average plasma protein binding rates of salvianol acid A with BSA, rat plasma, the New Zealand rabbit plasma and beagle dog plasma were  $(99.79 \pm 0.02)\%$ ,  $(99.79 \pm 0.03)\%$ ,  $(99.73 \pm 0.06)\%$ ,  $(99.81 \pm 0.03)\%$  in the plasma concentrations of  $5.0, 50.0, 100.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  respectively. **Conclusion:** The method has high sensitivity, good specificity and reproduction, with simple management thus fulfilling the requirement. Salvianol acid A shows a high binding power to plasma protein, and this was independent of the investigated concentrations and the different species.

**[Key words]** salvianol acid A; plasma protein binding rate; ultrafiltration

**[收稿日期]** 20120319(021)

**[基金项目]** 教育部博士点基金项目(20114425120011); 国家自然科学基金项目(0701097, 81072935)

**[第一作者]** 陈豆, 硕士, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel: 020-39356219, E-mail: lovely88752319@163.com

**[通讯作者]** \*张英丰, 博士, 副教授, 从事生物药剂学与药物动力学研究, Tel: 020-39358043, E-mail: zyfeng-2006@163.com

丹参为唇形科植物丹参的干燥根及根茎, 为《中国药典》所收载。丹参及其复方制剂被广泛用于治疗冠心病、心绞痛和脑血管疾病<sup>[1]</sup>。丹参主要有效成分可分为脂溶性丹参酮类和水溶性丹酚酸类<sup>[2]</sup>。丹酚酸 A 属酚酸类化合物, 是从丹参中提取的一种水溶性成分。近年的研究表明, 丹酚酸 A 在心脏保护、抗肝损伤、抗肿瘤等方面有显著的

活性<sup>[3]</sup>。

丹酚酸 A 由一分子丹参素与两分子咖啡酸综合而成。Shen 等<sup>[4]</sup>通过给大鼠静脉注射丹酚酸 A 后,在血浆中发现 5 个代谢产物,分别是 SalA-单葡萄糖醛酸苷,1-甲基-单葡萄糖醛酸苷,单甲基-丹酚酸 A,二甲基-丹酚酸 A 和二甲基-丹酚酸 A-单葡萄糖醛酸苷,其代谢途径主要为甲基化和葡萄糖醛酸化。另有文献报道丹酚酸 A 大鼠灌胃给药  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 其  $t_{1/2} = 3.29 \text{ h}$ , 为非隔室模型<sup>[5]</sup>, 大鼠静脉注射丹参素注射液  $5 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$  (丹酚酸 A  $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $t_{1/2\alpha} = (0.139 \pm 0.035) \text{ h}$ ,  $t_{1/2\beta} = (1.346 \pm 0.307) \text{ h}$ , 为二室模型<sup>[6]</sup>。丹参酚酸的肠吸收动力学研究表明,丹酚酸 A 在小肠的吸收率较低,为 20.5%<sup>[7]</sup>。而药物与血浆蛋白的结合率是药物代谢动力学的重要参数之一,与药物在体内的分布、代谢、排泄等密切相关,对新药研发及指导临床用药均具有重要意义<sup>[8]</sup>。目前对丹参酚酸蛋白结合反应的特性和结构相关性研究外<sup>[9]</sup>,有关丹酚酸 A 与血浆蛋白结合方面的文献尚少,因此本实验采用超滤法测定丹酚酸 A 的血浆蛋白结合率,为进一步展开丹酚酸 A 的代谢及药动学研究提供参考。

## 1 材料

**1.1 仪器** Dionex 高效液相色谱仪 (P680 泵, 170U 紫外检测器, Chromeleon 色谱工作站), 精密移液器 (美国 Synthesis 公司), AUW120D 型 1/10 万分析天平 (日本岛津), XW-80A 型 微型涡旋混合仪 (上海市沪西分析仪器厂有限公司), TG1650-WS 型 高速离心机 (上海卢湘仪), 超滤管 (Millipore 公司, 醋酸纤维素膜, 相对分子质量截留值 10 kD)。

**1.2 试药** 丹酚酸 A 对照品购自四川省维克奇生物科技有限公司, 批号 201102; BSA (美国 Sigma 公司, 生化试剂); 甲醇 (天津科密欧化学试剂开发中心, 色谱纯); 水为纯化水, 其他试剂为分析纯。

**1.3 动物** SD 大鼠, 雄性, 体重  $(200 \pm 20) \text{ g}$ , 由广州中医药大学实验动物中心提供 (许可证号 SKXK 粤 2008-0020), 毛细管眼眦取血, 置肝素钠抗凝离心管中,  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 分离血浆, 置于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷冻备用; 新西兰兔, 雄性, 体重  $1.8 \sim 2.2 \text{ kg}$ , 由广州中医药大学实验动物中心提供 (许可证号 SCXK 粤 2008-0020), 心脏采血, 置肝素钠抗凝离心管中,  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 分离血浆, 置于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷冻备用; 比格犬, 雄性, 体重  $12 \sim 15 \text{ kg}$ , 由广州比格犬基地提供, 前肢静脉采血, 置肝素钠抗凝离心管中,  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 分离血浆,

置于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷冻备用。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Kromasil 100-5  $\text{C}_{18}$  ( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \text{ } \mu\text{m}$ ) 色谱柱, 流动相甲醇-水 (含 0.4% 甲酸) ( $65:35$ ), 流速  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温室温, 检测波长 285 nm, 以定量环定量进样  $25 \text{ } \mu\text{L}$ 。理论板数按丹酚酸 A 计算应不低于 1 500。

### 2.2 溶液的配制

**2.2.1 磷酸盐缓冲液的配制** 取十二水磷酸氢二钠 19.028 g, 磷酸二氢钠 2.08 g, 氯化钠 4.4 g, 加水 1 000 mL, 即得 pH 7.4 的等渗 PBS 溶液。

**2.2.2 BSA 蛋白溶液的配制** 称 BSA 适量, 用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液溶解, 配制成  $45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 BSA 溶液。

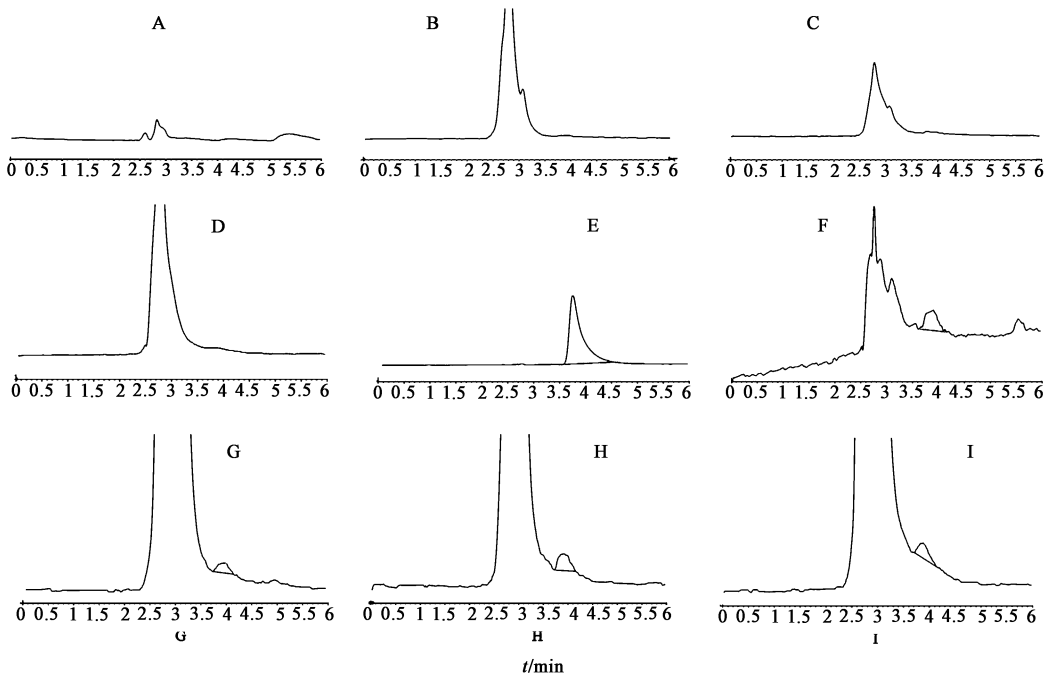
**2.2.3 对照品溶液的配制** 精密称取丹酚酸 A 对照品 2.0 mg, 置 2 mL 量瓶, 以 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (含 0.1% 甲酸) 溶解并定容, 摇匀, 即得丹酚酸 A 储备液。

**2.3 专属性考察** 取空白 BSA, 大鼠血浆, 新西兰兔血浆及比格犬血浆各  $400 \text{ } \mu\text{L}$ , 分别置于  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴中温育 2 h, 后移取所有温育的  $400 \text{ } \mu\text{L}$  血浆于超滤管中,  $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min, 得各空白血浆超滤液。后分别对空白血浆超滤液, 丹酚酸 A 对照品及样品进样  $25 \text{ } \mu\text{L}$ , 在上述色谱条件下, 丹酚酸 A 峰形良好, 无杂质峰干扰, 具有较高的专属性, 条件可行, 见图 1。

**2.4 线性关系考察** 将丹酚酸 A 储备液 ( $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 吸取适量, 以 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (含 0.1% 甲酸) 溶解并定容, 倍比稀释得 5.0, 50.0, 100.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品溶液, 分别取 5.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  对照品溶液 0.004, 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.4, 1.0 mL 至 2 mL 量瓶, 以 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (含 0.1% 甲酸) 溶解并定容, 得系列标准品溶液, 后各取上述标准品溶液  $400 \text{ } \mu\text{L}$  于超滤管内, 置于离心机中  $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min, 取超滤液  $25 \text{ } \mu\text{L}$  分别进样, 以丹酚酸 A 的峰面积对质量浓度进行线性回归, 计算回归方程为  $Y = 0.8073X + 0.0132$  ( $r = 0.9994$ ), 线性范围为  $0.01 \sim 2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.5 精密度考察** 取 PBS (含 0.1% 甲酸) 配制的 5.0, 50.0, 100.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的低、中、高 3 个浓度的丹酚酸 A 对照品溶液, 于 1 d 内分别测定 5 次, 计算日内 RSD; 连续测定 5 d, 计算日间 RSD。日内精密密度为 0.86%, 日间精密密度为 1.34%。

**2.6 超滤膜回收率考察** 取 PBS (含 0.1% 甲酸)



A. 空白 BSA; B. 空白大鼠血浆; C. 空白新西兰兔血浆; D. 空白比格犬血浆; E. 丹酚酸 A 对照品;  
F. BSA 血浆样品; G. 大鼠血浆样品; H. 新西兰兔血浆样品; I. 比格犬血浆样品

图 1 丹酚酸 A 血浆蛋白结合率的 HPLC

配制的 5.0, 50.0, 100.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的低、中、高 3 个浓度的丹酚酸 A 对照品溶液各 400  $\mu\text{L}$ , 置超滤管超滤膜上, 于离心机中以 6 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 20 min, 取超滤液 10  $\mu\text{L}$  进样测定, 与相应对照品溶液峰面积对比计算回收率。结果超滤膜回收率均 > 95%, 表明超滤膜对丹酚酸 A 无特异性吸附。结果见表 1。

表 1 丹酚酸 A 超滤膜回收率 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

| 质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 超滤膜回收率/%         |
|-------------------------------------|------------------|
| 5.0                                 | 99.48 $\pm$ 0.06 |
| 50.0                                | 99.61 $\pm$ 0.03 |
| 100.0                               | 99.56 $\pm$ 0.04 |

**2.7 血浆蛋白结合率试验<sup>[10]</sup>** 用移液枪精密吸取浓度为 1.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的丹酚酸 A 储备液 2, 20, 40  $\mu\text{L}$  于 1.5 mL Eppendorf 管内, 分别加入 BSA, 大鼠血浆, 新西兰兔血浆和比格犬血浆 400  $\mu\text{L}$  (每种血浆平行 4 份), 涡旋混合均匀, 得浓度为 5.0, 50.0, 100.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的低、中、高 3 种浓度含药血浆, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴温育 2 h, 后移取温育的 400  $\mu\text{L}$  含药血浆于超滤管超滤膜上, 于离心机中 6 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 20

min, 取超滤液 25  $\mu\text{L}$  注入高效液相色谱仪测定, 代入标曲计算超滤液中丹酚酸 A 浓度, 计算其血浆蛋白结合率。结果见表 2。

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

式中:  $\rho_{\text{超滤前}}$  为超滤前溶液中丹酚酸 A 的质量浓度,  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\rho_{\text{超滤液}}$  为超滤液中丹酚酸 A 的质量浓度,  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

数据经 SPSS 16.0 软件进行方差分析, 结果表明低、中、高 3 种浓度的丹酚酸 A 与 BSA, 大鼠血浆, 新西兰兔血浆和比格犬血浆的蛋白结合率无显著性差异。

### 3 讨论

研究药物-蛋白结合的传统方法有平衡透析法, 超滤法, 凝胶过滤法和超速离心法等, 其中以前两种方法最为常用<sup>[11]</sup>。平衡透析法操作简单, 经济实惠, 但透析平衡时间较长 (通常, 37  $^{\circ}\text{C}$  静置透析需要 16 ~ 48 h 达扩散平衡, 低温下需要更长时间), 可能会引起药物与蛋白的降解, 且易受血浆和缓冲液 pH, Gibbs-Donnan 效应, 透析膜非特异性的表面吸

表 2 丹酚酸 A 体外血浆蛋白结合率 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

| 质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | BSA/%            | 大鼠血浆/%           | 新西兰兔血浆/%         | 比格犬血浆/%          |
|-------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 5.0                                 | 99.78 $\pm$ 0.02 | 99.76 $\pm$ 0.03 | 99.68 $\pm$ 0.05 | 99.78 $\pm$ 0.03 |
| 50.0                                | 99.79 $\pm$ 0.03 | 99.78 $\pm$ 0.01 | 99.70 $\pm$ 0.09 | 99.80 $\pm$ 0.04 |
| 100.0                               | 99.81 $\pm$ 0.06 | 99.82 $\pm$ 0.01 | 99.80 $\pm$ 0.03 | 99.84 $\pm$ 0.01 |

附等因素的影响。超滤法减少了非特异性的表面吸附,缩短了平衡时间,加速了待测样品的溶解时间,且不受稀释效应和体积迁移的影响。

考察了药物的孵育时间,经考察孵育 2 h,丹酚酸 A 与血浆蛋白的结合达到平衡,且超滤速度不宜过大,一般为  $3\ 000 \sim 10\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,超滤速度过大易导致超滤膜破损,致样品泄漏,影响测定结果。血浆的肝素化与血浆药物结合蛋白量密切相关<sup>[12]</sup>。肝素化可使脂蛋白酶和肝脂酶释放,水解血浆甘油三酯,生成游离脂肪酸<sup>[13]</sup>。而游离脂肪酸可与药物竞争性结合血浆蛋白,升高血药浓度<sup>[14]</sup>。本实验所用到的大鼠血浆,新西兰兔血浆和比格犬血浆均为肝素钠抗凝后离心所得,为此本实验考察了肝素钠对丹酚酸 A 血浆蛋白结合率的影响。实验前另取大鼠全血,新西兰兔全血和比格犬全血置不含肝素钠抗凝的离心管内,立即于离心机中  $3\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取血浆,对比用于上述血浆蛋白结合率实验。结果表明,丹酚酸 A 在上述两种方法所取的血浆中其蛋白结合率无显著性差异。

丹参水溶性成分主要为酚酸类化合物:丹参素,咖啡酸、原儿茶醛、原儿茶酸、丹酚酸(A, B, C, D, E, F, G)以及紫草酸和迷迭香酸等<sup>[15]</sup>。其中丹参素是各种丹参酚酸的基本化学结构。本研究表明,丹酚酸 A 与 BSA,大鼠血浆,新西兰兔血浆及比格犬血浆的蛋白结合率分别为  $(99.79 \pm 0.02)\%$ ,  $(99.79 \pm 0.03)\%$ ,  $(99.73 \pm 0.06)\%$ ,  $(99.81 \pm 0.03)\%$ ,属高强度结合,且丹酚酸 A 与血浆蛋白的结合无浓度依赖性,与不同种属的血浆蛋白其结合率无显著性差异。这与我们实验室先前做过的丹参酚酸类成分中丹酚酸 B、丹参素、紫草酸、迷迭香酸的蛋白结合率均  $> 95\%$  类同,由此可推测具有相同结构母核的一类药物其蛋白结合率具有一定的相似性,可间接指导临床用药。且由郭宾等<sup>[16]</sup>关于药物与血浆蛋白结合的药理学基础可知,丹酚酸 A 的高蛋白结合率可使其在体内的表现分布容积相对较大,半衰期增长,肾清除速率减慢。

#### [参考文献]

[1] Zhou L, Zuo Z, Chow M S. Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use [J]. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45 (12): 1345.  
[2] 刘长青,何百寅,冯峰,等. 正交试验优选水提后丹参药渣中丹参酮 II A 的提取工艺[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(9): 32.  
[3] 潘迎峰,张建兵,丁洁,等. 丹酚酸 A 的药理研究进展

[J]. *中国中医药科技*, 2008, 15(4): 294.  
[4] Shen Y, Wang X, Xu L, et al. Characterization of metabolites in rat plasma after intravenous administration of salvianolic acid A by liquid Chromatography/time-of-flight mass spectrometry and liquid Chromatography/ion trap mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(12): 1810.  
[5] Pei L, Bao Y, Wang H, et al. A sensitive method for determination of salvianolic acid A in rat plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2008, 22(7): 786.  
[6] Hou Y Y, Peng J M, Chao R B. Pharmacokinetic study of salvianolic acid A in rat after intravenous administration of Danshen injection [J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21(6): 598.  
[7] 张向荣,潘卫三. 丹参酚酸 A 在大鼠小肠的吸收动力学研究[M]. *沈阳药科大学学报*, 2002, 19(1): 14.  
[8] 刘睿,谢跃生,潘桂湘,等. 药物蛋白结合率测定方法的研究进展[J]. *天津中医药*, 2007, 24(6): 526.  
[9] 邹晓丽,王湘敏,郭海芳,等. 丹参酚酸与牛血清白蛋白结合反应的特性和结构相关性研究[J]. *中草药*, 2010, 41(8): 1271.  
[10] 吴阳,张英丰. 超滤法测定脱水穿心莲内酯的血浆蛋白结合率[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(21): 57.  
[11] TANG Y H, ZHU H Y, ZHANG Y 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.  
[12] Li B, Suwan J, Martin J G, et al. Oversulfated chondroitin sulfate interaction with heparin-binding proteins: new insights into adverse reactions from contaminated heparins [J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 78(3): 292.  
[13] Basu D, Manjur J, Jin W. Determination of lipoprotein lipase activity using a novel fluorescent lipase assay [J]. *J Lipid Res*, 2011, 52(4): 826.  
[14] Barclay J L, Nelson C N, Ishikawa M, et al. GH-dependent STAT5 signaling plays an important role in hepatic lipid metabolism [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(1): 181.  
[15] 中国医学科学院药物研究所. 中草药现代研究. 第 2 卷[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997: 479.  
[16] 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.

[责任编辑 顾雪竹]