

## 丹酚酸 B 与大鼠血浆蛋白结合率的测定

景春杰<sup>1,2</sup>, 陈晓辉<sup>1</sup>, 刘璇<sup>2</sup>, 毕开顺<sup>1\*</sup>, 果德安<sup>2\*</sup>

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 中国科学院上海药物研究所上海中药现代化研究中心, 上海 201203)

**摘要:** 建立测定丹酚酸 B 与大鼠血浆蛋白结合率的方法; 体外采用平衡透析法, 模拟丹酚酸 B 与血浆蛋白的结合过程, 体内采用超滤法, 并以高效液相色谱法进行测定。透析内液用甲醇沉淀蛋白, 透析外液过滤后直接测定。结果透析外液线性范围为 0.5~20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 透析内液的线性范围为 2~200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 提取回收率 68.6%~81.9%, 日内日间精密度均小于 8.5%, 丹酚酸 B 的体外血浆蛋白结合率为 75.2%, 体内血浆蛋白结合率为 92.1%, 丹酚酸 B 与大鼠血浆蛋白结合率较高。建立的方法灵敏度高, 重现性好, 操作简单, 能够满足分析要求。

**关键词:** 丹酚酸 B; 血浆蛋白结合率; 平衡透析法; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 03-0343-04

## Determination of the binding rate of rat plasma protein with salvianolic acid B

JING Chun-jie<sup>1,2</sup>, CHEN Xiao-hui<sup>1</sup>, LIU Xuan<sup>2</sup>, BI Kai-shun<sup>1\*</sup>, GUO De-an<sup>2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Shanghai Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** This paper is aimed to report the development of a method for the determination of the binding rate of plasma protein with salvianolic acid B. *In vitro*, equilibrium dialysis method was used to imitate the binding process between salvianolic acid B and plasma protein, *in vivo*, ultrafiltration method was used and the binding rate with HPLC was determined. Plasma samples were treated with methanol to precipitate the protein, and the buffer solution was directly determined after filtering. The calibration curve of the buffer solution was linear in the range of 0.5 – 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The calibration curve of the plasma was linear in the range of 2 – 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The extract recovery was 68.6% – 81.9%. RSDs of intra- and inter-day precisions were all less than 8.5%. The binding rates of plasma protein with salvianolic acid B *in vitro* was 75.2% and *in vivo* was 92.1%. This paper shows the high binding power of salvianolic acid B to plasma protein with high sensitivity, good reproduction, simple management and fulfilling the requirement.

**Key words:** salvianolic acid B; protein binding rate; equilibrium dialysis; HPLC

丹参为唇形科植物丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 的干燥根及根茎, 具有祛瘀止痛、活血调经、养心除烦的功效。丹酚酸 B (salvianolic acid B, SAB) 由 3 分子丹参素与 1 分子咖啡酸缩合而成, 作为丹参

中的主要水溶性成分, 具有清除氧自由基、抗氧化、保护心肌的作用<sup>[1-3]</sup>。药物血浆蛋白结合率是药代动力学的重要参数之一, 影响药物在体内的分布、排泄和代谢速率, 对药物的消除半衰期也有影响, 更重要的是它与药物的药理作用强度密切相关。本文用平衡透析法结合超滤法, 并用高效液相色谱法测定了丹酚酸 B 大鼠体内及体外血浆蛋白结合率, 为进一步研究丹酚酸 B 与人血浆蛋白结合率奠定了方法学基

收稿日期: 2009-08-22.

基金项目: 国家科技重大专项课题资助项目 (2009ZX09308); “重大新药创制” 科技重大专项资助项目 (2009ZX09304).

\*通讯作者 Tel: 86-24-23986016, E-mail: bikaishun@yahoo.com  
Tel: 86-21-50805522, E-mail: gda5958@163.com

础, 对临床合理用药具有一定的参考价值。

## 材料与amp;方法

**仪器与试剂** Agilent 1100 高效液相色谱仪 (安捷伦科技有限公司); BT25S 型电子天平 (Sardoris 公司); HCG-36A 氮吹仪 (东莞市永先电子仪器厂); 2-16K 型冷冻高速离心机 (德国 Sigma 公司); 透析袋 MD25 (8000-14000) (鼎国生物技术有限公司); 超滤离心管 (Millipore, 10K)。丹酚酸 B 对照品 (上海海灿生物科技有限公司); 苯甲酸对照品 (内标, 上海海灿生物科技有限公司); 乙腈、甲醇为色谱纯 (Burdick & Jackson, MI, USA); 盐酸为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司); 纯净水由 MilliQ 纯水制备系统制备; 磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氯化钠均为分析纯。

**动物** 健康 SD 大鼠, 雄性, 体重 ( $250 \pm 20$ ) g, 中国科学院上海药物研究所实验动物中心提供, 实验前禁食 24 h, 自由饮水。

**色谱条件** Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm) 和保护柱 (20 mm × 4 mm ID, 5 μm) 为 Palo Alto (CA, USA) 公司产品; 流动相为乙腈-1%甲酸水溶液 (23 : 77); 流速为 1.2 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温为 30 °C; 检测波长为 286 nm; 进样量为 10 μL。

### 溶液配制

**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 于 1 L 量瓶中, 加去离子水溶解并稀释至刻度, 得 pH 7.4 磷酸缓冲液。

**丹酚酸 B 系列溶液 I** 精密称定丹酚酸 B 对照品 2.0 mg, 置 2 mL 量瓶中, 用去离子水溶解并稀释成质量浓度分别为 10、25、50、100、250 和 500 μg·mL<sup>-1</sup> 的对照系列溶液, 用于透析内液的方法学研究。

**丹酚酸 B 系列溶液 II** 精密称定丹酚酸 B 对照品 2.0 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用空白透析液稀释成质量浓度分别为 5、10、20、50 和 100 μg·mL<sup>-1</sup> 的对照系列溶液, 用于透析外液的方法学研究。

**丹酚酸 B 系列溶液 III** 精密称定丹酚酸 B 对照品 1.0 mg, 置 2 mL 量瓶中, 用空白透析液稀释成浓度分别为 40、100 和 200 μg·mL<sup>-1</sup> 的对照系列溶液, 用于蛋白结合率的研究。

**内标溶液** 精密称定苯甲酸对照品 5.6 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得 560 μg·mL<sup>-1</sup> 内标溶液。

### 标准曲线

**透析内液** 取空白血浆 0.4 mL, 加入丹酚酸 B

系列溶液 I 100 μL, 配成相当于丹酚酸 B 血浆浓度为 2、5、10、50、100 和 200 μg·mL<sup>-1</sup> 的模拟生物样品, 按“透析内液样品的预处理”项下方法操作。以 SAB 的峰面积 (y) 对其血药浓度 (c) 作图, 求得回归方程。

**透析外液** 取空白透析液 1 mL, 加入丹酚酸 B 系列溶液 II 100 μL, 配成相当于丹酚酸 B 血浆浓度为 0.5、1、2、5、10 和 20 μg·mL<sup>-1</sup> 的模拟透析液样品, 按“透析外液样品的预处理”项下方法操作。以 SAB 的峰面积 (y) 对其浓度 (c) 作图, 求得回归方程。

### 准确度与精密度

**透析内液** 取空白血浆 0.4 mL, 按“标准曲线”项下的方法操作, 配制成低、中、高 3 个浓度 (5、20 和 100 μg·mL<sup>-1</sup>) 的模拟生物样品。考察方法的日内和日间精密度 (RSD) 和准确度。

**透析外液** 取空白透析液 1 mL, 按“标准曲线”项下的方法操作, 配制成低、中、高 3 个浓度 (1、5 和 10 μg·mL<sup>-1</sup>) 的模拟透析液样品。考察方法的日内和日间精密度 (RSD) 和准确度。

**提取回收率** 精密吸取空白血浆 0.4 mL, 按“标准曲线”项下的方法操作, 配制成低、中、高 3 种浓度, 每个浓度 3 样本分析, 以提取后的面积与未经提取直接进样获得的色谱峰面积之比, 考察样品的绝对提取回收率。

**稳定性** 精密吸取空白血浆 0.4 mL, 按“标准曲线”项下的方法操作, 配制成低、中、高 3 种浓度的丹酚酸 B 血浆样品。考察血浆样品预处理后室温放置 4 h 和 -70 °C 下放置一周的稳定性。

**透析内液样品的预处理** 取血浆样品 (透析内液) 0.5 mL, 置 10 mL 具塞离心管中, 依次加入内标溶液 60 μL、甲醇 1 mL 涡旋混合 30 s, 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 取上清液过微孔滤膜 (0.22 μm), 取滤液 10 μL 注入高效液相色谱仪测定。

**透析外液样品的预处理** 取透析外液样品用水系过滤器 (孔径 0.45 μm) 过滤后精密吸取 1 mL, 加入 10% 盐酸水溶液 50 μL, 内标溶液 50 μL, 涡旋混合后离心 (3 000 r·min<sup>-1</sup>) 5 min, 取上清液 10 μL 注入高效液相色谱仪测定。

**平衡透析实验方法** 将空白透析液浸泡后的透析袋一端折叠用线结扎, 将空白血浆 2 mL 加入透析袋, 透析袋内留一小空气泡, 将透析袋另一端扎紧, 使其悬浮于盛有 20 mL 透析外液的试管中, 调整透析袋的高度, 使其内外液面保持同一水平, 并避免透析袋贴壁。透析外液的质量浓度分别为 2、5 和 10

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 将该试管于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  放置至药物扩散平衡。透析结束后, 用 10% 高氯酸溶液检查透析外液是否有蛋白漏出, 有漏出者该样品作废。

**蛋白结合率测定** 分别测定透析袋内药物质量浓度  $A$  (总质量浓度) 和透析外液药物质量浓度  $B$  (游离药物质量浓度), 根据公式  $F = (A-B)/A$  计算血浆蛋白结合率。

**体内血浆蛋白结合率实验方法** SD 大鼠 5 只, 尾静脉注射 SAB  $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 10 min 后腹主动脉取血,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取血浆 0.5 mL 按“透析内液样品的预处理”项下操作, 另取血浆 0.5 mL 于超滤离心管中,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $7\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 30 min, 取滤液 10  $\mu\text{L}$  注入高效液相色谱仪测定。

## 结果

### 1 方法的专属性

在本色谱条件下, 苯甲酸 (内标) 和丹酚酸 B 的保留时间分别为 10.27 和 11.98 min, 内源性物质对测定无干扰, 见图 1。

### 2 标准曲线的制备

透析内液的回归方程为:  $y = 0.002\ 8 + 0.053\ 8\ c$ ,  $r = 0.999\ 8$  ( $n = 7$ )。根据标准曲线, 丹酚酸 B 在  $2\sim 200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内线性关系良好, 方法的定量下限为  $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

透析外液的回归方程为:  $y = 0.010\ 1 + 0.190\ 4\ c$ ,  $r = 1.000$  ( $n = 6$ )。根据标准曲线, 丹酚酸 B 在  $0.5\sim 20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内线性关系良好, 方法的定量下限为  $0.5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

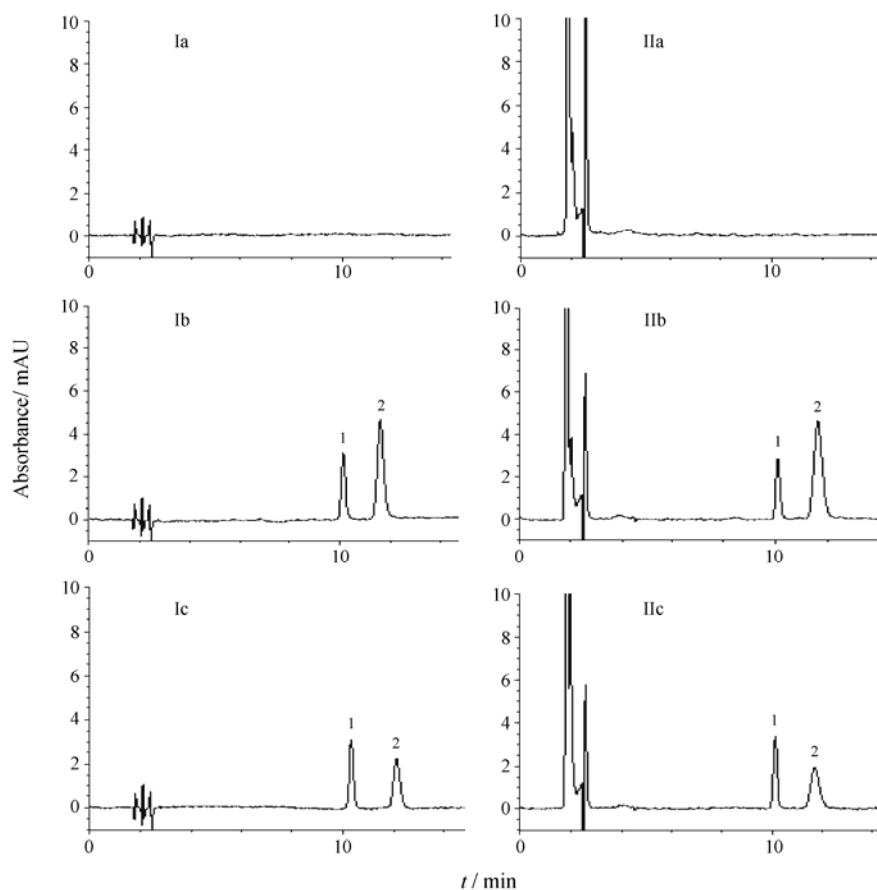
### 3 准确度与精密度

透析内液和透析外液的日内和日间精密度 (RSD)、准确度 (RE) 见表 1。

### 4 提取回收率与稳定性

3 种浓度下丹酚酸 B 的平均提取回收率分别为 68.6%、81.9% 和 71.4%; RSD 分别为 2.0%、3.4% 和 0.3%, 同样方法测定内标的提取回收率为 73.0%, RSD 为 0.5%。

考察结果表明血浆样品在室温放置 4 h 和  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  下放置一周等条件下稳定性良好。



**Figure 1** HPLC chromatograms of the buffer solution and the plasma. Ia: Blank buffer solution; Ib: Blank buffer solution spiked with benzoic acid (internal standard) and salvianolic acid B (SAB); Ic: The sample out of the dialysis membrane; IIa: Blank plasma; IIb: Blank plasma spiked with internal standard and SAB; IIc: The sample in the dialysis membrane. Peak 1: Benzoic acid; 2: SAB

**Table 1** Accuracy and precision of the samples in the dialysis membrane (A) and out of the dialysis membrane (B)

Sample	Concentration / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RE/%	RSD/%	
			Intra-day	Inter-day
A	5	-5.5	5.9	8.5
	20	-2.3	1.7	2.3
	100	-2.6	4.1	5.1
B	1	-1.6	5.5	7.1
	5	5.6	1.0	3.6
	10	4.1	1.0	1.8

 $n = 6$ 

## 5 平衡时间

在透析袋内以空白透析液代替血浆,透析外液中丹酚酸 B 的质量浓度分别为 2、5 和 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,按“平衡透析实验方法”及“透析外液样品的预处理”项下方法测定透析袋内、外丹酚酸 B 质量浓度,以当日标准曲线计算透析内、外液丹酚酸 B 质量浓度,以两者质量浓度比值确定平衡时间,见表 2。

**Table 2** Equilibration time

Concentration / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Ratio (in / out)				
	24 h	48 h	60 h	72 h	84 h
2	0.93	0.99	0.99	1.0	1.0
5	0.90	0.91	1.0	1.0	1.0
10	0.95	0.99	1.0	1.0	1.0

## 6 体外血浆蛋白结合率

结果低、中、高 3 个质量浓度的血浆蛋白结合率分别为 74.4%、73.6%和 77.5%。经  $t$  检验三者无显著性差异。

## 7 体内血浆蛋白结合率

分别测定血浆中药物质量浓度 A (总质量浓度)和超滤后药物质量浓度 B (游离药物质量浓度),根据公式  $F = (A-B)/A$  计算血浆蛋白结合率,结果 5 只老鼠的血浆蛋白结合率分别为 92.5%、91.7%、91.9%、92.0%和 92.8%。

## 讨论

平衡透析法、超滤法是血浆蛋白结合率常用的测定方法。平衡透析法的优点是原理简单、操作方便、可测定处于平衡状态下的游离药物的浓度。超滤法的

优点是测定快速,只需几十分钟即可收集到足够供测定的血浆超滤液。

从本实验结果可以看出,丹酚酸 B 的血浆蛋白结合率不具有质量浓度依赖性,平均血浆蛋白结合率是 75.2%,体内血浆蛋白结合率是 92.1%,并有文献<sup>[4]</sup>报道丹酚酸 B 体内血浆蛋白结合率为 (83.78  $\pm$  10.5)%。同时实验证明了丹酚酸 B 具有较高的血浆结合率,推测其半衰期较长。有文献<sup>[5]</sup>报道丹酚酸 B 的半衰期为 7 h,与推测相符。稳定的血浆蛋白结合率,使发挥药效作用的游离型药物质量浓度保持相对稳定,同时血浆蛋白结合具有可逆性,当游离型药物因组织分布而质量浓度下降时,结合型药物会与蛋白解离,补充到组织中去,从而有利于药效的持续充分发挥<sup>[6]</sup>。本实验所建立的血浆和透析液样品预处理的方法与已有文献报道的方法不同,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重现性,能够满足临床上生物药品分析的要求。

## References

- [1] Zhong J, Tang MK, Zhang Y, et al. Effect of salvianolic acid B on neural cells damage and neurogenesis after brain ischemia-reperfusion in rats [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2007, 42: 716-721.
- [2] Huang YS, Zhang JT. Antioxidative effect of three water-soluble components isolated from *Salvia miltiorrhiza* in vitro [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1992, 27: 96-100.
- [3] Wang XB, Yu F, Liu F. Protective effect of salvianolic acid B on oxidative injury in HUVECs and its possible mechanism [J]. J Southeast Univ (Med Sci Ed) (东南大学学报 医学版), 2008, 27: 42-46.
- [4] Wu YT, Chen YT. Bioavailability of salvianolic acid B in conscious and freely moving rats [J]. Int J Pharm, 2006, 326: 25-31.
- [5] Ma YM, Wang TM. A solid-phase extraction method for high-performance liquid chromatographic determination of salvianolic acid B in rabbit plasma: application to pharmacokinetic study [J]. Biomed Chromatogr, 2007, 21: 217-220.
- [6] Li QH, Cui MY, Sui XF. Determination of protein-bound fraction of serum of syringopicroside [J]. J Harbin Univ Commer (Nat Sci Ed) (哈尔滨商业大学学报 自然科学版), 2008, 24: 148-150.