

丹参注射液体外对格列喹酮 血浆蛋白结合率的影响

张瑞¹, 杨晔¹, 王炜¹, 倪妮¹, 尹登科^{1,2}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012;

2. 安徽省中医药科学院药物制剂研究所, 安徽 合肥 230012)

[摘要]目的 考察丹参注射液体外对格列喹酮血浆蛋白结合率的影响。方法 采用平衡透析法和高效液相色谱法, 分别在有无丹参注射液的情况下对格列喹酮血浆蛋白结合率进行测定。结果 格列喹酮高浓度(12.6 $\mu\text{g/mL}$)、中浓度(6.3 $\mu\text{g/mL}$)、低浓度(1.26 $\mu\text{g/mL}$)的血浆蛋白结合率差异无统计学意义($P > 0.05$)。在含有高浓度(750 mg/mL)、中浓度(375 mg/mL)、低浓度(75 mg/mL)丹参注射液时, 格列喹酮(12.6 $\mu\text{g/mL}$)的血浆蛋白结合率分别为(82.6 \pm 3.11)%、(87.3 \pm 9.80)%、(92.6 \pm 4.21)%。在含有高浓度丹参注射液时, 格列喹酮血浆蛋白结合率显著降低($P < 0.05$)。结论 在临床剂量下, 丹参注射剂不会影响格列喹酮血浆蛋白结合率。

[关键词]格列喹酮; 丹参注射液; 平衡透析法; 血浆蛋白结合率

[中图分类号]R285.5 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2017.02.020

格列喹酮是第二代磺酰脲类口服降糖药物, 其通过与胰岛B细胞上磺酰脲受体结合的方式来控制血糖^[1]。这种结合使得胰岛素的分泌易于控制, 同时通过靶细胞受体数目的增加以及组织对胰岛素敏感性的增强来改善其他方式的胰岛素对抗^[2]。格列喹酮是一种高血浆蛋白结合率的药物, 口服后经肝脏代谢。其药物代谢产物95%以上通过胆管进入肠道, 最后从粪便排出体外, 几乎不从肾脏途径排泄, 是肾功能衰退或不全的糖尿病患者优先考虑的药物^[3]。

丹参为唇形科鼠尾草植物 *Salvia Miltiorrhiza* Bunge 的干燥根, 为常用的活血化瘀中药, 始载于《神农本草经》, 被列为上品。其性微寒、味苦、无毒, 有祛瘀止痛、活血通经、凉血消肿、除烦清心、养血安神、降低血糖之功效。丹参含有多种化学成分, 总体可分为丹参酮和丹酚酸两大类化合物, 丹参酮类化合物以改善血液循环、抗菌和抗炎作用为主; 而丹酚酸类化合物的抗氧化、抗凝血和细胞保护作用尤为突出^[4]。

已有研究^[5]表明, 格列喹酮与黄芪注射液合用, 能够改变格列喹酮在糖尿病大鼠体内药物动力学过程, 使药物动力学参数发生改变。丹参-黄芪合用对糖尿病模型大鼠肾功能具有显著的保护作用^[6]。

药物的血浆蛋白结合率是药物动力学的重要参数, 是药物动力学研究的基本内容之一。其关系着药物的组织分布、生物转化、排泄等过程, 更与药物的药理活性密切相关^[7]。本研究采用平衡透析法研究丹参注射液在体外对格列喹酮血浆蛋白结合率的影响, 旨在为两者合用提供一定的参考。

1 材料

1.1 仪器 LC-15C 高效液相色谱仪: 日本 Shimadzu 公司; TG16-WS 台式高速离心机: 湖南湘仪集团; WH-3 微型漩涡混合仪: 上海沪西仪器有限公司; JY1000 电子天平: 上海良平仪器仪表有限公司; KQ2200 型超声波清洗器: 江苏省昆山市超声仪器有限公司; HH-S2 系列恒温水浴锅: 江苏金坛市环宇科学仪器厂; 透析袋(分子截留量: 8 000 ~ 14 000): 上海源叶生物科技有限公司。

1.2 试剂 丹参注射液: 购自上海中西制药有限公司, 每毫升含有 1.5 g 生药; 格列喹酮标准品购自上海源叶生物科技有限公司, 纯度 $> 98\%$, 批号 YY91634; 甲醇购自上海星可高纯溶剂有限公司, 色谱纯; 二氯甲烷购自上海润捷化学试剂有限公司, 分析纯; 乙腈购自天津市大茂化学试剂厂, 色谱纯; 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)为实验室自制(含有磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氯化钠); 纯净水为实验室自制。

1.3 动物 健康雄性 SD 大鼠, 体质量 200 ~ 220 g, 由安徽医科大学实验动物中心提供, 生产许可证号为 SCXK(皖)2015-002。实验前禁食 12 h, 自由饮水。大鼠眼眶取血, 肝素抗凝, 静置 30 min 后

基金项目:国家自然科学基金项目(81102682); 安徽省高等学校自然科学基金项目(KJ2015A130)

作者简介:张瑞(1992-), 男, 硕士研究生

通信作者:尹登科, yindengke@sina.com

4 000 r/min离心 10 min,取上清-20 ℃冻存备用。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 空白透析液的配制 精密取磷酸二氢钾 14.11 g,磷酸氢二钾 2.59 g,氯化钠 1.99 g,用氢氧化钠调 pH 至 7.4,用蒸馏水定容至 1 000 mL,即得。

2.1.2 格列喹酮储备液的配制 精密称取格列喹酮 12.6 mg,用甲醇溶解,定容至 100 mL,摇匀得 0.126 mg/mL 格列喹酮储备液,置 4 ℃冰箱保存。

2.1.3 透析外液 A 的配制 取格列喹酮储备液 2 mL,加入离心管中,精确加入 PBS 18 mL,使格列喹酮浓度为 12.6 μg/mL(高浓度)。取格列喹酮储备液 1 mL,加入离心管中,精确加入 PBS 19 mL,使格列喹酮浓度为 6.3 μg/mL(中浓度)。取格列喹酮储备液 0.2 mL,加入离心管中,精确加入 PBS 19.8 mL,使格列喹酮浓度为 1.26 μg/mL(低浓度)。

2.1.4 透析外液 B 的配制 取格列喹酮储备液 2 mL,加入到离心管中,分别加入每毫升含生药 1.5 g 的丹参注射液 10、5、1 mL,再分别补加空白透析液 8、13、17 mL,使格列喹酮浓度为 12.6 μg/mL,使得丹参(生药)高、中、低浓度分别为 750、375、75 mg/mL。

2.1.5 格列喹酮标准液的配制 精密吸取格列喹酮标准品 1.0 mg,置于 1 mL 容量瓶中,加入甲醇定容至刻度,再稀释成系列浓度的标准溶液。

2.2 色谱条件 色谱柱:Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×200 mm,5 μm);柱温:25 ℃;流动相:乙腈:水(65:35,V/V);流速:1 mL/min;检测波长:294 nm;进样量:20 μL。

2.3 样品的处理与测定 透析内液:取血浆 200 μL,加入二氯甲烷 1 mL,涡漩 2 min,4 000 r/min 离心 10 min,取二氯甲烷层,50 ℃氮气吹干,用 200 μL 甲醇溶解,过滤头,取 20 μL 进样。透析外液样品按同法处理并测定。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。连续型变量以“均数±标准差($\bar{x}\pm s$)”表示。格列喹酮组组内血浆蛋白结合率比较采用单因素方差分析,丹参-格列喹酮组与格列喹酮组比较采用 *t* 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2.5 专属性考察 分别取空白血浆、空白透析液、含格列喹酮的血浆和透析液样品以及含有丹参注射液和格列喹酮的血浆和透析液样品,按“2.3”项下方法处理,在“2.2”项下色谱条件测定,高效液相色谱图见图 1。空白血浆、空白透析液以及丹参注射液

在此条件下对格列喹酮的测定无干扰。

2.6 方法学考察

2.6.1 透析内液标准曲线的制备 取格列喹酮标准品溶液适量加入空白血浆,使之成为浓度分别为 100、50、20、10、5、1、0.25 μg/mL 的格列喹酮标准品溶液样本。按“2.3”项下方法处理并测定后,以标准品浓度(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程: $y=1\,317.2x+1\,519.8$, $r^2=0.996\,2$ 。格列喹酮浓度在 0.25~100 μg/mL 范围内与峰面积的线性关系良好。

2.6.2 透析外液标准曲线的制备 取格列喹酮标准品溶液适量加入空白透析液,使之成为浓度为 20、10、5、1、0.5、0.25 μg/mL 的格列喹酮标准品溶液样本。按“2.3”项下方法处理并测定后,以标准品浓度(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程: $y=1\,492.3x+786.4$, $r^2=0.998\,1$ 。格列喹酮浓度在 0.25~20 μg/mL 范围内与峰面积的线性关系良好。

2.7 精密度试验 透析内液:取高浓度(50 μg/mL)、中浓度(10 μg/mL)、低浓度(1 μg/mL)格列喹酮标准液各 200 μL,吹干,加入 200 μL 空白血浆,得 50、10、1 μg/mL 含血浆的格列喹酮样品。按“2.3”项下方法处理。于日内不同时间处理并测定 3 次,不同日内处理并测定 3 次,记录格列喹酮的峰面积并计算格列喹酮的浓度和精密度。高、中、低 3 种浓度样品日内精密度 RSD 均小于 14.73%,日间精密度均小于 14.53%。

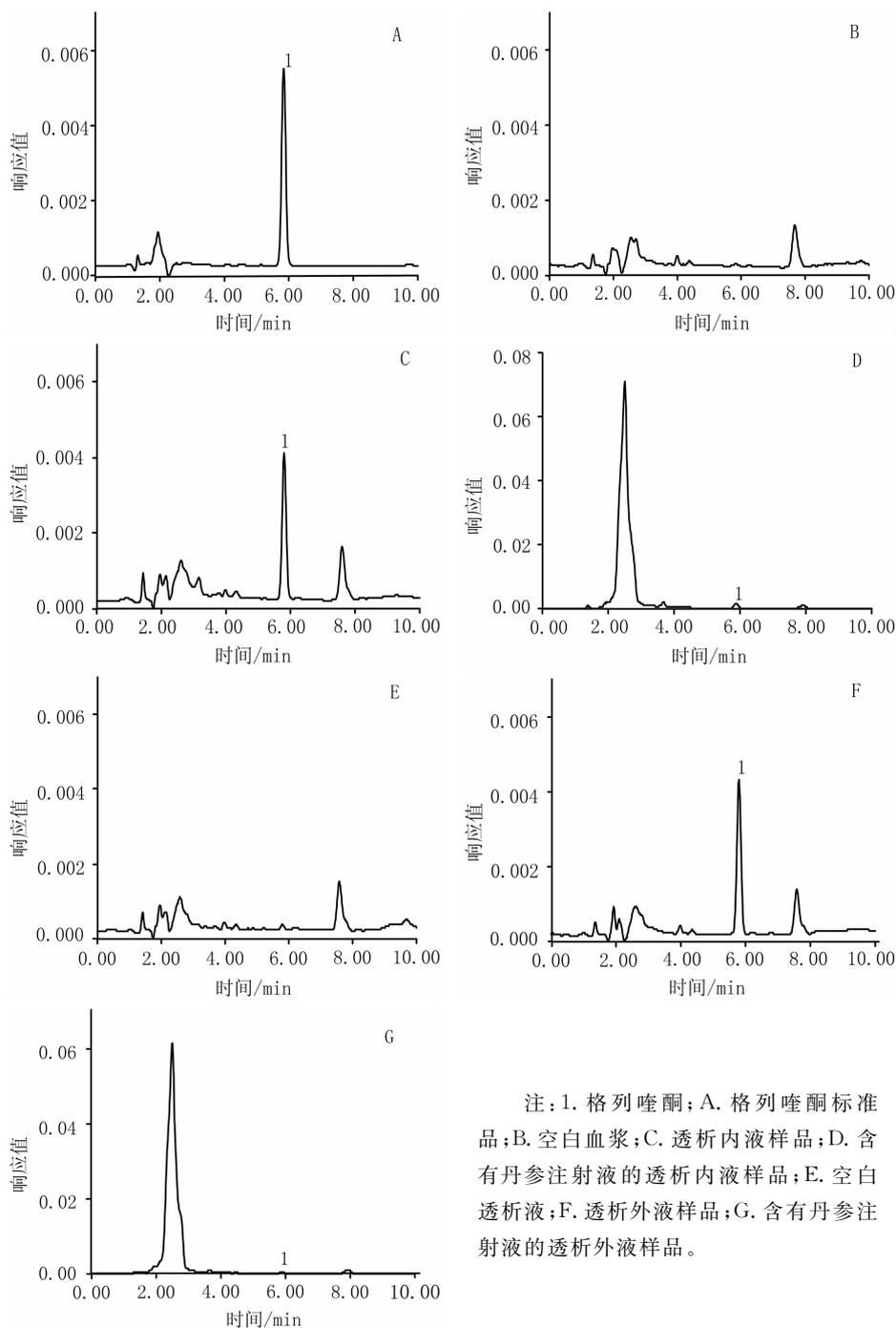
透析外液:分别取 10、5、0.5 μg/mL 格列喹酮标准液 200 μL,吹干,加入 200 μL 空白透析液,得 10、5、0.5 μg/mL 含血浆的格列喹酮样品。按“2.3”项下方法处理。于日内不同时间处理并测定 3 次,不同日内处理并测定 3 次,记录格列喹酮的峰面积并计算格列喹酮的浓度和精密度。高、中、低 3 种浓度样品日内精密度 RSD 均小于 11.43%,日间精密度 RSD 均小于 15.09%。

2.8 回收率试验 透析内液:分别取高浓度(50 μg/mL)、中浓度(10 μg/mL)、低浓度(1 μg/mL)格列喹酮标准液 200 μL,吹干,加入 200 μL 空白血浆,得 50、10、1 μg/mL 含血浆的格列喹酮样品。按“2.3”项下方法处理,每批 3 个样品,记录格列喹酮的峰面积并计算格列喹酮的回收率。高、中、低 3 种浓度的样品回收率均在 100.1%~113.2%之间,RSD 均小于 12.33%。

透析外液:分别取高浓度(10 μg/mL)、中浓度(5 μg/mL)、低浓度(0.5 μg/mL)格列喹酮标准液

200 μL , 吹干, 加入 200 μL 空白透析液, 得 10、5、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含血浆的格列喹酮样品。按“2.3”项下方法处理, 每批 3 个样品, 记录格列喹酮的峰面积并

计算格列喹酮的回收率。高、中、低 3 种浓度的样品回收率均在 95.9%~112.4% 之间, RSD 均小于 4.33%。见图 1。



注: 1. 格列喹酮; A. 格列喹酮标准品; B. 空白血浆; C. 透析内液样品; D. 含有丹参注射液的透析内液样品; E. 空白透析液; F. 透析外液样品; G. 含有丹参注射液的透析外液样品。

图 1 各样品的高效液相色谱图

2.9 格列喹酮血浆蛋白结合率的测定 平衡透析法: 实验前先将透析袋预处理后在空白透析液中室温浸泡 24 h。取一端扎紧的透析袋, 除去袋内外水分, 精密吸取 1 mL 空白血浆加至透析袋中, 扎紧袋口。置悬浮于盛有 20 mL 透析外液 A (含格列喹酮) 的具盖广口瓶中, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中直到药物扩散达到平衡。透析结束后, 用 10% 的高氯酸溶液检

查透析袋外溶液有无蛋白漏出, 有漏出者作废。另以 20 mL 透析外液 B (含丹参注射液与格列喹酮), 处理方法同上, 分别测定透析袋内血浆药物浓度 (总浓度) 及透析袋外缓冲液中药物浓度 (游离药物浓度), 血浆蛋白结合率 = (透析内液血浆药物浓度 - 透析外液血浆药物浓度) / 透析内液血浆药物浓度。随着浓度改变, 格列喹酮的血浆蛋白结合率变化差

异无统计学意义($P > 0.05$);在含有高浓度(750 mg/mL)丹参注射液时,格列喹酮的血浆蛋白结合率显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 不同浓度格列喹酮血浆蛋白结合率比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	血浆蛋白结合率/%
12.6 $\mu\text{g/mL}$ 格列喹酮	93.8 \pm 0.73
6.3 $\mu\text{g/mL}$ 格列喹酮	94.4 \pm 0.61
1.26 $\mu\text{g/mL}$ 格列喹酮	96.4 \pm 2.34
750 mg/mL 丹参+12.6 $\mu\text{g/mL}$ 格列喹酮	82.6 \pm 3.11*
375 mg/mL 丹参+12.6 $\mu\text{g/mL}$ 格列喹酮	87.3 \pm 9.80
75 mg/mL 丹参+12.6 $\mu\text{g/mL}$ 格列喹酮	92.6 \pm 4.21

注:与12.6 $\mu\text{g/mL}$ 格列喹酮组比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

在临床用药过程中,两种药物合用可能会发生药物的相互作用。药物在体内经过吸收、分布、代谢、排泄的过程,其中,分布过程的相互作用主要是因为药物在组织中与血浆蛋白结合。只有非结合的药物才能参与血浆与组织的转运,从而达到治疗作用。而血浆蛋白结合率高的药物,与其他药物合用时,极有可能发生竞争结合,从而使得游离药物浓度增加,药效增加亦会导致毒性增强。格列喹酮是第二代磺酰脲类口服降糖药物,具有高血浆蛋白结合率的特点。因此,本实验通过平衡透析法,研究丹参注射液对格列喹酮血浆蛋白结合率的影响。

目前,血浆蛋白结合率测定的常用方法主要包括平衡透析法、超滤法、光谱法以及毛细管电泳法^[8-11]等。其中,平衡透析法是测定血浆蛋白结合率的经典方法,最为简单实用。透析时,要保持稳定的环境温度、pH强度,尽可能地达到体内环境条件,测得的结果才能最大限度反映体内情况。本研究采用截留分子量为8 000~14 000的透析袋进行实验,由高效液相色谱图可看出,基线平稳,无明显杂质峰,表明血浆中大量内源性物质没有漏出。实验结果表明,格列喹酮在3种浓度下的血浆蛋白结合率相差不大,组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。本实验以高浓度(12.6 $\mu\text{g/mL}$)的格列喹酮作为考察对象与不同浓度丹参注射液合用,结果表明,在含有高浓度丹参(每毫升含生药750 mg)时,

经过24 h透析后,格列喹酮的血浆蛋白结合率缩小为(82.6 \pm 3.11)%($P < 0.05$)。说明两药合用后,高浓度丹参可减少格列喹酮的血浆蛋白结合率,差异有统计学意义($P < 0.05$)。临床丹参成人剂量为每日0.5 g/kg,按体质量为60 kg,血液容积为4 L计算,丹参血药浓度大约为7.5 mg/mL,其浓度远低于本实验高浓度。本研究结果表明,丹参注射液不会对格列喹酮血浆蛋白结合率产生影响,合用安全。但在丹参浓度达到750 mg/mL时,会降低格列喹酮的血浆蛋白结合率。

参考文献:

- [1] 李峻,吴红梅. 格列喹酮治疗糖尿病的循证临床证据[J]. 中国循证医学杂志,2006,6(9): 690-694.
- [2] 张丹丹,陆菊明,康怡,等. 格列喹酮、格列齐特和格列本脲对2型糖尿病患者早相胰岛素分泌和血糖波动的影响[J]. 中国糖尿病杂志,2012,20(1):44-47.
- [3] MALAISSE W J. Gliquidone contributes to improvement of type 2 diabetes mellitus management: a review of pharmacokinetic and clinical trial data[J]. Drugs R D, 2006, 7(6): 331-337.
- [4] 刘艾林,李铭源,王一涛,等. 丹参药理学活性物质基础研究现状[J]. 中国药学杂志,2007,42(9):641-646.
- [5] ZHANG F, WEI Y, ZHOU Y, et al. Pharmacokinetics and hepatic uptake of gliquidone affected by Huangqi injection[J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2014, 39(4): 255-261.
- [6] 尹娟娟,杨晔,王庆保,等. 益气活血法改善糖尿病肾病大鼠肾小管重吸收功能的研究[J]. 中药材,2013,36(6):953-958.
- [7] 叶勇,周莉玲,晏亦林,等. 超滤法测定磷酸川芎嗪的血浆蛋白结合率[J]. 中药材,2010,33(8):1282-1285.
- [8] 刘颖,陈志强,陶蓓蕾,等. 螯毒灵血浆蛋白结合率的测定[J]. 中国中药杂志,2009,34(21):2817-2820.
- [9] 姚志红,曹秀珍,邵萌,等. 超滤法测定甲基原薯蓣皂苷的血浆蛋白结合率[J]. 中国中药杂志,2008,33(11): 1291-1294.
- [10] 周大炜,李乐道,李发美. 药物-蛋白结合作用的分析方法研究[J]. 色谱,2004,22(2): 116-120.
- [11] 周玲玲,袁吉培,汪尔康. 毛细管电泳电化学发光用于丙吡胺及其与血浆蛋白结合率的测定[J]. 分析化学,2009,37(1):53-56.

(收稿日期:2016-06-07;编辑:张倩)

去甲斑蝥素固体自微乳制备及稳定性考察

桂 贇^{1,2}, 胡容峰^{1,2,3,4}, 王 斌¹, 周 红^{1,2}, 金 栋^{1,2}

(1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012; 2. 新安医学教育部重点实验室, 安徽 合肥 230038;

3. 安徽省“115”新安医药研究与开发创新团队, 安徽 合肥 230038;

4. 安徽省中药研究与开发重点实验室, 安徽 合肥 230038)

[摘要]目的 制备去甲斑蝥素固体自微乳并对其稳定性进行考察。方法 以包封率和收率为考察指标, 采用球晶制备技术, 正交设计优化制备工艺, 实现球晶技术一步固化去甲斑蝥素自微乳, 并对去甲斑蝥素固体自微乳粒径大小、电位、自乳化速率、稳定性等进行考察。结果 去甲斑蝥素自微乳最佳处方的平均包封率和收率分别为 77.39% 和 84.5%, 粒径为 22.76 nm, Zeta 电位为 -2.77 mV。自乳化速率在不同介质中相差不大, 50 s 内均可完成自乳化。稳定性实验显示, 去甲斑蝥素自微乳的粒径大小、电位和包封率在 60 ℃ 及强光照试验下无变化。结论 自制的去甲斑蝥素固体自微乳稳定可靠。

[关键词]去甲斑蝥素; 固体自微乳; 正交试验法; 包封率; 稳定性

[中图分类号]R283.6 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2017.02.021

去甲斑蝥素的分子式为 $C_8H_8O_4$, 由斑蝥素合成衍生制得, 是中国首先开发的用于治疗原发性肝癌^[1]和肝炎的新药, 其抗肿瘤活性很强^[2], 可以升高白细胞, 且无骨髓抑制作用。然而, 去甲斑蝥素难溶于水, 且在体内代谢快^[3], 生物利用度较低^[4]。为了提高其生物利用度, 延长去甲斑蝥素在体内的作

用时间, 伊美珍等^[5]将其制成微乳、脂质体、微球、纳米粒等剂型。本实验通过制剂手段, 采用正交设计试验优化处方工艺, 实现了去甲斑蝥素固体自微乳的制备并对其稳定性进行考察。

1 仪器及试剂

1.1 仪器 电子天平: 北京赛多利斯仪器系统有限公司; 85-2 恒温磁力搅拌器: 金坛市金分仪器有限公司; HH-S2 恒温水浴锅: 江苏省金坛市环宇科学仪器厂; Malvern Nano-ZS90 粒径电位测定仪: 英国马尔文仪器有限公司; Agilent1260 高效液相

基金项目:国家自然科学基金项目(81274100, 81573615)

作者简介:桂贇(1989-), 男, 硕士研究生

通信作者:胡容峰, hurongfeng@163.com

In Vitro Effect of *Salvia miltiorrhiza* Injection on Plasma Protein Binding Rate of Gliquidone

ZHANG Rui¹, YANG Ye¹, WANG Wei¹, NI Ni¹, YIN Deng-ke^{1,2}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. Institute of Pharmaceutics, Anhui Academy of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the *in vitro* effect of *Salvia miltiorrhiza* injection on the plasma protein binding rate of gliquidone. **Methods** Equilibrium dialysis and high-performance liquid chromatography were used to measure the plasma protein binding rate of gliquidone with the presence or absence of *Salvia miltiorrhiza* injection. **Results** There were no significant differences in plasma protein binding rate between high, medium, and low concentrations of gliquidone (12.6, 6.3, and 1.26 $\mu\text{g/mL}$, respectively) ($P > 0.05$). With the presence of the high-, medium-, and low-concentration *Salvia miltiorrhiza* injections (750, 375, and 75 mg/mL , respectively), the plasma protein binding rates of gliquidone were (82.6 ± 3.11) , $(87.3 \pm 9.80)\%$, and $(92.6 \pm 4.21)\%$, respectively. With the presence of high-concentration *Salvia miltiorrhiza* injection, there was a significant reduction in the plasma protein binding rate of gliquidone ($P < 0.05$). **Conclusion** *Salvia miltiorrhiza* injection at the dose used in clinical practice does not affect the plasma protein binding rate of gliquidone.

[Key words] Gliquidone; *Salvia miltiorrhiza* injection; Equilibrium dialysis; Plasma protein binding rate