

HPLC-超滤法测定羟基酪醇与常氧及缺氧大鼠血浆蛋白的结合率

王维刚^{1,2,3}, 王芄^{1,2,3}, 李晓琳^{2,3}, 刘天龙^{2,3}, 杜玮泽^{1,2,3}, 郭姿良^{2,3,4}, 陈升富^{1,2,3}, 李茂星^{1,2,3,4*} (1.甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000; 2.联勤保障部队第九四〇医院临床药学科, 兰州 730050; 3.甘肃省高原药学行业技术中心, 兰州 730050; 4.兰州大学药学院, 兰州 730030)

摘要: 目的 建立羟基酪醇血浆蛋白结合率的测定方法, 比较常氧及缺氧大鼠血浆中羟基酪醇蛋白结合率的异同。方法 采用 HPLC-超滤法测定羟基酪醇与常氧及缺氧大鼠血浆的蛋白结合率。结果 当大鼠血浆中羟基酪醇浓度为 3, 6, 12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 羟基酪醇与常氧大鼠血浆的蛋白结合率分别为(17.23 \pm 1.11)%, (16.88 \pm 1.37)%和(16.70 \pm 0.98)%, 与缺氧大鼠血浆的蛋白结合率分别为(12.31 \pm 1.79)%, (12.75 \pm 1.20)%和(13.42 \pm 1.98)%, 两者比较差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 羟基酪醇与常氧大鼠血浆蛋白属于低强度结合, 且在 3~12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 不具浓度依赖性, 而羟基酪醇与缺氧大鼠血浆蛋白结合强度明显低于与常氧大鼠血浆蛋白的结合。

关键词: 羟基酪醇; HPLC-超滤法; 常氧; 缺氧; 血浆蛋白结合率

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)24-3167-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.24.019

引用本文: 王维刚, 王芄, 李晓琳, 等. HPLC-超滤法测定羟基酪醇与常氧及缺氧大鼠血浆蛋白的结合率[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(24): 3167-3172.

Determination of Plasma Protein Binding Rate of Hydroxytyrosol in Normoxic and Hypoxic Rat by HPLC-Ultrafiltration Method

WANG Weigang^{1,2,3}, WANG Peng^{1,2,3}, LI Xiaolin^{2,3}, LIU Tianlong^{2,3}, DU Weize^{1,2,3}, GUO Ziliang^{2,3,4}, CHEN Shengfu^{1,2,3}, LI Maoxing^{1,2,3,4*} (1.School of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2.Department of Clinical Pharmacy, The 940th Hospital of Joint Logistic Support Force of PLA, Lanzhou 730050, China; 3.Gansu Plateau Pharmaceutical Technology Center, Lanzhou 730050, China; 4.School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730030, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determination of plasma protein binding rate of hydroxytyrosol, and compare the difference of plasma protein binding rate in normoxic and hypoxic rats. **METHODS** The protein binding rate of hydroxytyrosol in normoxic and hypoxic rats plasma was determined by HPLC-ultrafiltration. **RESULTS** When the concentration of hydroxytyrosol in rat plasma was 3, 6 and 12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the plasma protein binding rates of hydroxytyrosol with normoxic rats were (17.23 \pm 1.11)%, (16.88 \pm 1.37)% and (16.70 \pm 0.98)%, and the plasma protein binding rates with hypoxic rats were (12.31 \pm 1.79)%, (12.75 \pm 1.20)% and (13.42 \pm 1.98)%. The difference of the plasma protein binding rate was significant between the normoxic and hypoxic rats($P<0.01$). **CONCLUSION** The binding strength of hydroxytyrosol to plasma protein of normoxic rats is low and does not show concentration dependence within the concentration range of 3~12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The binding strength of hydroxytyrosol to plasma protein of hypoxic rats is significantly lower than that of hydroxytyrosol to plasma protein of normoxic rats.

KEYWORDS: hydroxytyrosol; HPLC-ultrafiltration; normoxia; hypoxia; plasma protein binding rate

羟基酪醇, 化学名为 3,4-二羟基苯乙醇, 是一种双亲性(亲水亲油)物质, 化学结构见图 1。主要以酯化物橄榄苦苷的形式分布在橄榄和女贞子中^[1-2], 以苯乙醇苷类化合物毛蕊花糖苷和松果菊苷的形式存在于肉苁蓉、地黄及马先蒿等药用植物中^[3-5]。羟基酪醇是一种天然多酚化合物, 具有

抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗抑郁和预防骨质疏松等广泛的药理活性^[2,6]。相关研究发现, 毛蕊花糖苷在体内^[7-8]及体外^[9]模拟肠道条件下可分解为羟基酪醇, 且课题组前期研究发现, 羟基酪醇能够增强缺氧环境下 PC12 细胞活力, 改善细胞氧化应激及线粒体损伤状态, 发挥抗缺氧药理作用。由

基金项目: 甘肃省重点研发计划项目(20YF3FA035); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(31920200010); 940 医院青年培育项目(2021yxky060); 940 医院应急医学科研项目(20yjky018)

作者简介: 王维刚, 男, 硕士生 Tel: (0931)8994676 E-mail: wangweigangxgg@163.com *通信作者: 李茂星, 男, 博士, 主任药师 Tel: (0931)8994676 E-mail: limaox2020@aliyun.com

于羟基酪醇亲水亲油的特性,其生物利用度高,但在体内半衰期短^[6],可被快速从体内消除,从而影响药效发挥。药物的血浆蛋白结合率是药动学重要参数之一,可以影响药物在体内的处置过程与药理作用^[10]。而缺氧条件可引起药物与血浆蛋白结合率的改变,如泼尼松龙^[11]的血浆蛋白结合率升高,甲氧氯普胺^[12]的血浆蛋白结合率下降。目前尚未见羟基酪醇血浆蛋白结合率的报道,本研究参考文献^[13-16]方法,建立 HPLC-超滤法测定羟基酪醇血浆蛋白结合率的方法,对羟基酪醇血浆蛋白结合率以及缺氧对其结合率的影响进行研究,为羟基酪醇的临床用药及新剂型研发提供参考。

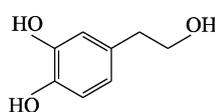


图1 羟基酪醇结构式

Fig. 1 Structure of hydroxytyrosol

1 材料

1.1 试剂

羟基酪醇(成都普瑞法科技开发有限公司,批号:PRF10100843;纯度 $\geq 98\%$);色谱纯乙酸乙酯(批号:2020102201)、灭菌注射用水(批号:M20080903B)均购自四川科伦药业股份有限公司;色谱纯乙腈(瑞典 OCEANPAK 公司,批号:20100310G202);PBS 磷酸盐缓冲液(美国 HyClone 公司,批号:SH30256.01)。

1.2 仪器

Ultimate 3000 DGLC 型高效液相色谱仪(美国 Therm Fisher Scientific 公司); Millipore 10 K 型超滤管(美国 Millipore 公司); FLYDWC50-IIC 低压低氧动物实验舱(贵州风雷航空军械有限公司); HH.SY21 恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司); 3K15 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); RUC-2-25 型离心浓缩仪(德国 Labconco 公司); JPXH-D 可调式涡旋混匀器(上海旌派仪器有限公司); BP210S 电子天平(赛多利斯有限公司)。

1.3 动物

生产许可证 SPF 级 Wistar 大鼠(δ , 12 只, 质量 200~250 g), 购自中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院动物实验科, 生产许可证号: SCXK(军)2017-0023; 动物使用许可证号: SYXK(军)2017-0046。饲养室温度: $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 相对湿度:

40%~60%。所有大鼠采用标准饲料进行喂养, 自由进水。

2 方法与结果

2.1 大鼠血浆收集

12 只 δ Wistar 大鼠随机分为羟基酪醇常氧组和羟基酪醇缺氧组, 每组 6 只。常氧及缺氧条件大鼠采血前均禁食 12 h, 自由饮水。将缺氧组大鼠放入低压低氧动物实验舱内, 以 $10 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ 的速度将舱内海拔升高到 7 500 m, 缺氧暴露 3 d。常氧及缺氧模型大鼠经眼眶静脉采血, 置于肝素钠抗凝离心管, $4\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离血浆备用。

2.2 色谱条件

色谱柱: Thermo Hypersil Gold C_{18} (4.6 mm \times 150 mm, 0.5 μm); 保护柱: Thermo 嵌入式保护柱套 (4.6/4.0 mm), Thermo Hypersil GOLD 保护柱柱芯 (10 mm \times 4 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B), 按表 1 中程序梯度洗脱; 柱温 30°C ; 检测波长 281 nm; 进样量 15 μL , 流速 $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution program of flow phase

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~15	5 \rightarrow 8	95 \rightarrow 92
15~20	8 \rightarrow 95	92 \rightarrow 5
20~25	5	95

2.3 溶液的配制

2.3.1 对照品储备液的配制 精密称取羟基酪醇对照品 2.0 mg 于 10 mL 量瓶, 甲醇定容至刻度线, 制成羟基酪醇质量浓度为 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。

2.3.2 工作液的配制 移取适量 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品储备液, 用 PBS 溶液分别稀释得到 30, 60, 120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的羟基酪醇工作液(即用即配)。

2.3.3 质控样品的配制 取低、中、高浓度的羟基酪醇工作液, 分别加入大鼠空白血浆和超滤液配制药物浓度为 3, 6, 12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆及超滤液质控样品。

2.4 生物样品的制备

2.4.1 血浆样品 样品制备: 取羟基酪醇样品工作液, 加入常氧及缺氧大鼠空白血浆进行稀释, 涡旋混匀, 分别得到羟基酪醇低、中、高剂量(3, 6, 12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)血浆样品, 分别将 300 μL 低、中、高给药血浆样品置于 37°C 水浴中孵育 40 min, 待样品预处理后, 进行 HPLC 测定。

样品预处理:取 50 μL 血浆样品,加入 400 μL 乙酸乙酯,涡旋 5 min 混匀,在 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 15 min,取乙酸乙酯层于 1.5 mL 离心管中,重复萃取 2 次,37 $^{\circ}\text{C}$ 离心浓缩仪挥干,加入 50 μL 初始流动相复溶,在 4 $^{\circ}\text{C}$, 15 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 5 min,取上清液进行 HPLC 分析。

2.4.2 超滤液样品 分别将低、中、高剂量(3, 6, 12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)血浆样品置于超滤管中,在 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,制备得到低、中、高浓度超滤液样品,取 50 μL 置于内插管,直接进行 HPLC 测定。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 将羟基酪醇对照品溶液、空白血浆、血浆样品、空白超滤液及超滤液样品进行 HPLC 分析,在以上色谱条件下,羟基酪醇峰形良好,血浆样品和超滤液均无杂峰干扰,见图 1。

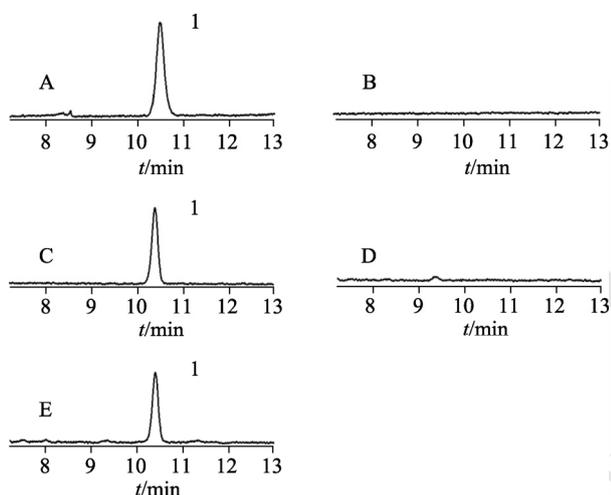


图 1 高效液相色谱图

A-羟基酪醇对照品溶液; B-空白血浆; C-血浆样品; D-空白超滤液; E-超滤液样品; 1-羟基酪醇。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-hydroxytyrosol standard substance solution; B-blank plasma; C-plasma sample; D-blank ultrafiltrate; E-ultrafiltrate sample; 1-hydroxytyrosol.

2.5.2 线性关系考察

2.5.2.1 血浆标准曲线 精密吸取羟基酪醇对照品储备液适量加入大鼠空白血浆制成浓度为 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,按“2.4.1”项下方法预处理后进行 HPLC 分析。以待测物峰面积 Y 与浓度 $X(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 进行线性回归,得标准曲线方程: $Y=0.1610X-0.0225(r^2=0.9997)$,说明在 0.2~20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.5.2.2 超滤液标准曲线 精密吸取羟基酪醇对照品储备液加入大鼠空白血浆超滤液,制成浓度

为 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,进行 HPLC 分析。同样以待测物峰面积 Y 与浓度 $X(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 进行线性回归,得标准曲线方程: $Y=0.1697X-0.0129(r^2=0.9981)$,说明在 0.2~20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.5.3 精密度试验 取低、中、高浓度血浆及超滤液质控样品,血浆样品按“2.4.1”项下方法进行进样前处理, HPLC 分析药物含量。在同日内连续进样 6 次计算日内精密度,连续测定 3 d 计算日间精密度。结果表明,血浆及超滤液样品日内精密度和日间精密度的 RSD 均 < 10%,精密度良好。

2.5.4 回收率试验 取低、中、高浓度血浆及超滤液质控样品,其中血浆样品按“2.4.1”项下方法进行前处理, HPLC 分析,得峰面积 A_1 ,并用标准曲线方程计算得到实测浓度 C_1 ;另取空白血浆,按“2.4.1”项下方法操作,浓缩仪挥干后,残渣分别用含低、中、高浓度羟基酪醇的初始流动相复溶,进样分析,得峰面积 A_2 ,以 A_1 与 A_2 的比值(百分比)计算血浆样品提取回收率。以实测浓度 C_1 与相对应加入浓度的比值(百分比)计算血浆及超滤液样品方法回收率。结果见表 2。羟基酪醇在血浆及超滤液中的回收率良好,符合生物样品分析要求。

表 2 血浆及超滤液样品羟基酪醇的回收率($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab. 2 Recovery rates of hydroxytyrosol in plasma and ultrafiltrate samples($\bar{x}\pm s, n=3$)

加入浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	血浆回收率/%		超滤液方法回收率/%
	提取回收率	方法回收率	
3	98.15±0.61	101.15±0.74	93.94±0.54
6	98.09±0.05	96.88±0.15	98.93±0.55
12	102.72±1.87	108.85±1.48	97.97±1.67

2.5.5 稳定性试验 取低、中、高浓度血浆及超滤液质控样品。血浆样品按“2.4.1”项下方法处理,于室温(21±2) $^{\circ}\text{C}$ 放置 0, 0.5, 1 h 和 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 0, 2, 4 h 后进行 HPLC 分析,考察处理后羟基酪醇血浆样品的稳定性情况;羟基酪醇超滤液样品同样于室温放置 0, 0.5, 1 h 和 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 0, 2, 4 h,直接进样分析,考察羟基酪醇超滤液样品的稳定性。结果表明,低、中、高血浆及超滤液样品在室温和 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 RSD 均 < 5%,表明羟基酪醇血浆和超滤液样品在所考察时间及温度下稳定性良好。

2.6 血浆蛋白结合率

2.6.1 超滤膜非特异性结合研究 取羟基酪醇储

备对照品液适量,用 PBS 稀释,配制成理论浓度依次为 3,6,12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的缓冲液溶液,分取 50 μL 于内插管进样分析,另取 250 μL 于经预处理的超滤离心管中,置于低温离心机中以 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 超速离心 10 min,测定滤液中羟基酪醇的药物浓度,依据缓冲液(C_{pre})及滤液中(C_{post})药物浓度,计算超滤膜非特异性结合率(nonspecific binding, NSB), $\text{NSB}(\%)=(C_{\text{pre}}-C_{\text{post}})/C_{\text{pre}}\times 100\%$ 。结果见表 3,算得 3,6,12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下,NSB 分别为(2.86 \pm 0.74)%, (3.21 \pm 0.53)%和(3.95 \pm 0.41)%,平均 NSB 为(3.34 \pm 0.56)%($n=3$)。结果表明,超滤管滤膜对羟基酪醇吸附作用小,因此可忽略超滤膜对羟基酪醇的吸附。

表 3 超滤膜对羟基酪醇的非特异性结合率($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 3 Nonspecific binding rate of hydroxytyrosol by ultrafiltration membrane ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

理论浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$C_{\text{pre}}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$C_{\text{post}}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	NSB/%
3	3.06 \pm 0.04	2.97 \pm 0.02	2.86 \pm 0.74
6	5.77 \pm 0.12	5.58 \pm 0.12	3.21 \pm 0.53
12	11.20 \pm 0.11	10.76 \pm 0.11	3.95 \pm 0.41

2.6.2 血浆蛋白结合率测定 分别将 300 μL 低、中、高常氧(缺氧)给药血浆样品置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育 40 min。取 250 μL 常氧(缺氧)血浆样品按“2.4.2”项下方法制备超滤液,取超滤液 50 μL 置于内插管中,进行 HPLC 测定。另取 50 μL 常氧(缺氧)含药血浆样品,按“2.4.1”项下方法处理后进行 HPLC 测定,检测超滤液及血浆中羟基酪醇的浓度,用以下公式计算羟基酪醇与常氧(缺氧)血浆蛋白结合率(plasma protein binding rate, PPB), $\text{PPB}(\%)=(C_{\text{T}}-C_{\text{F}})/C_{\text{T}}\times 100$,其中 C_{T} 为羟基酪醇血浆总浓度, C_{F} 为超滤液中羟基酪醇的浓度,结果见表 4。

2.7 方法的优化

2.7.1 超滤液回收率考察 用超滤法进行血浆蛋白结合率考察,选用分子量截留为 10 K 的超滤管可将血浆蛋白和内源性物质有效截留,不干扰羟

基酪醇测定。考察超滤时间及离心力对超滤液得率的影响,超滤液体积与总体积之比应在 0.3~0.6 的标准以内。以回收率及 RSD 为指标,设血浆样品体积为 300 μL ,考察羟基酪醇血浆样品的超滤条件,转速考察 6 000,8 000,10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,超滤时间考察 10,15,20 min。结果显示,在 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下,离心 10 min 时,超滤液回收率为(38.89 \pm 0.51)%,符合超滤液得率的要求,且 RSD 较小,为 1.31%($n=3$),当继续增加离心时间时,超滤液回收率没有明显的变化。最终确定羟基酪醇超滤条件为 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 10 min。结果见表 5~6。

2.7.2 平衡时间考察 取羟基酪醇血浆样品在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅孵育,于 40,120,180 min 后,取样分别测定血浆中羟基酪醇总浓度和超滤液中羟基酪醇游离浓度,结果 40 min 时羟基酪醇与血浆蛋白结合达到平衡。

3 讨论

本研究通过建立 HPLC-超滤法测定羟基酪醇含量,探究常氧及缺氧 2 种不同状态下大鼠血浆蛋白结合率,并比较两者的差异,发现常氧时羟基酪醇血浆蛋白结合率为 16.70%~17.23%,缺氧大鼠的血浆蛋白结合率为 12.31%~13.42%,表明羟基酪醇与大鼠血浆蛋白属于低强度结合。

平衡透析法和超滤法是血浆蛋白结合率的常用测定方法。平衡透析法操作简单,但透析平衡时间较长,可能会引起药物与蛋白的降解,并且容易受到血浆和缓冲液 pH、Gibbs-Donnan 效应及体积迁移效应等多种因素的影响^[17-18]。超滤法较平衡透析法更简便快速,通常在几十分钟之内即可收集超滤液进行药物游离浓度的测定,可用于不稳定药物的测定。多酚类化合物羟基酪醇稳定性差,易被氧化,其生物样品在室温贮存 1 h 及 4 $^{\circ}\text{C}$ 贮存 4 h 内保持稳定,因此采用超滤法进行羟基酪醇血浆蛋白结合率的测定。

表 4 羟基酪醇与常氧及缺氧大鼠血浆蛋白结合率($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 4 Plasma protein binding rate of hydroxytyrosol in normoxia and hypoxia rats ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

加入浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	常氧组			缺氧组		
	$C_{\text{T}}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$C_{\text{F}}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	PPB/%	$C_{\text{T}}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$C_{\text{F}}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	PPB/%
3	2.81 \pm 0.14	2.32 \pm 0.13	17.23 \pm 1.11	2.67 \pm 0.14	2.34 \pm 0.15	12.31 \pm 1.79 ¹⁾
6	5.98 \pm 0.25	4.97 \pm 0.20	16.88 \pm 1.37	5.34 \pm 0.28	4.66 \pm 0.25	12.75 \pm 1.20 ¹⁾
12	11.28 \pm 0.51	9.40 \pm 0.50	16.70 \pm 0.98	10.78 \pm 0.22	9.33 \pm 0.29	13.42 \pm 1.98 ¹⁾

注:与常氧组比较,¹⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the normoxic group, ¹⁾ $P<0.01$.

表 5 不同转速下血浆超滤液得率($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 5 Yield of plasma ultrafiltrate at different rotating speeds($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

转速/r·min ⁻¹	总体积/ μL	超滤液回收率/%	RSD/%
6 000	300	7.78±0.51	6.55
8 000	300	18.44±0.51	2.76
10 000	300	38.89±0.51	1.31

表 6 不同离心时间下血浆超滤液得率($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 6 Yield of plasma ultrafiltrate at different centrifugation time($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

离心时间/min	总体积/ μL	超滤液回收率/%	RSD/%
10	300	38.89±0.51	1.31
15	300	39.44±0.84	2.13
20	300	40.56±0.69	1.71

从实验结果得出, 在 $3\sim 12\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度范围内, 羟基酪醇与常氧及缺氧大鼠的血浆蛋白结合率呈现出非浓度依赖特性, 其平均结合率分别为 16.94%和 12.83%, 表明羟基酪醇与大鼠血浆蛋白有低强度结合, 而在缺氧大鼠血浆中的蛋白结合率较常氧大鼠的血浆蛋白结合率有较小幅度的降低。当血浆中白蛋白水平下降, 蛋白质结构发生改变及内源性竞争物质出现, 可使一些疾病治疗中使用的药物与血浆蛋白的结合率降低, 如肾功能障碍的患者、肝脏损伤的患者等^[19]。缺氧条件不仅可引起肝损伤和肾损伤等机体病理损伤, 还可引起机体微环境的改变, 如大鼠急进高原后, 血浆中白蛋白、血红蛋白、血氧饱和度及氧分压等生理指标明显降低^[20], 这可能是引起羟基酪醇与缺氧大鼠血浆蛋白结合率降低的主要原因。另一方面, 缺氧还可引起白蛋白终端氨基酸序列被氧化修饰, 使其结构发生改变, 导致与钴等过渡金属离子的结合率明显下降^[21], 但这种白蛋白结构的改变是否可导致其与药物的结合率降低尚不明确, 有待进一步研究。

药物经吸收进入血液后, 一部分与血浆蛋白结合为结合型药物, 另一部分为发挥药效的游离型药物, 当游离型药物浓度因为组织分布而下降时, 结合型药物会与血浆蛋白解离, 进而补充到组织中, 使药效能持续发挥作用^[22]。尽管羟基酪醇的血浆蛋白结合率低, 游离型药物浓度高, 可被快速分布至各组织, 但同时代谢及消除速率快, 药效持续时间短。缺氧后, 羟基酪醇血浆蛋白结合率较常氧有所降低, 可能导致其代谢、消除速率进一步加快, 药效发挥时间更短, 无法产生持

续疗效。因此, 临床应用需要调节其用量, 且有必要改造其构型或者研发缓、控释剂型, 以提高其血浆蛋白结合率, 使其消除速率减慢, 从而发挥更优的药效。本实验重点测定了羟基酪醇与常氧及缺氧大鼠的血浆蛋白结合率, 为临床合理设计给药提供了依据, 也为羟基酪醇作为抗缺氧新药的研发提供思路。

REFERENCES

- [1] XU B X, LI Z M, ZHANG X L, et al. Pharmacokinetic differences between oleuropein and hydroxytyrosol in Ligustri Lucidi Fructus in rat plasma[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2017, 39(7): 1387-1390.
- [2] LUO C, CHEN M Z, LI Y. Progresses in pharmacological effects of hydroxytyrosol[J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2019, 54(20): 1642-1646.
- [3] CAO X Y, LI M X, MAO T, et al. Study on the extraction technology for active constituents of Tibetan medicine *Pedicularis kansuensis*[J]. China Pharm(中国药房), 2017, 28(10): 1357-1360.
- [4] LIANG J S, XUE C L, WU M H, et al. Determination and chemometric evaluation of six phenylethanolic glycosides in *Cistanche deserticola* and *Cistanche sinensis* by UPLC[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2021, 41(2): 226-235.
- [5] WANG Y, ZHOU Q, ZHANG X L, et al. Simultaneous determination of eight compounds contents of *Rehmanniae Radix* and its different processed products by HPLC[J]. J Chin Med Mat(中药材), 2021(1): 64-68.
- [6] TANG J, LIU L, LI C M, et al. Research progress on pharmacological action and pharmacokinetics of hydroxytyrosol[J]. China J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2021, 27(6): 241-250.
- [7] QI M, XIONG A Z, LI P F, et al. Identification of acteoside and its major metabolites in rat urine by ultra-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci, 2013(940): 77-85.
- [8] WU Y T, LIN L C, TSAI T H. Measurement of free hydroxytyrosol in microdialysates from blood and brain of anesthetized rats by liquid chromatography with fluorescence detection[J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(16): 3501-3507.
- [9] CUI Q L, PAN Y N, XU X T, et al. The metabolic profile of acteoside produced by human or rat intestinal bacteria or intestinal enzyme *in vitro* employed UPLC-Q-TOF-MS[J]. Fitoterapia, 2016(109): 67-74.
- [10] WANG N X, ZHANG X L, ZHAI X J, et al. Effect of capsaicin on the plasma protein binding rate of simvastatin determined by ultrafiltration[J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2017, 52(22): 2018-2022.
- [11] ARANCIBIA A, GAI M N, CHÁVEZ J, et al. Pharmacokinetics of prednisolone in man during acute and chronic exposure to high altitude[J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 2005, 43(2): 85-91.

- [12] ZHANG J H, WANG R, WANG L J, et al. Effect of "acute exposure to high altitude" on the protein binding and pharmacokinetics of metoclopramide[J]. J Lanzhou Univ: Med Sci(兰州大学学报: 医学版), 2017, 43(3): 13-17.
- [13] LI T J, WANG Y, YUAN B, et al. Determination of plasma protein binding rate of temsirolimus in different species of plasma by ultrafiltration combined with HPLC[J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2020, 36(19): 3122-3125.
- [14] CHEN A Y, DONG W B, CHENG M, et al. Determination of sunitinib and its plasma protein binding rate in human plasma by HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(1): 57-59.
- [15] JIA M X, DUAN J J, ZHAO Q, et al. Determination of plasma protein binding rate of voriconazole by ultrafiltration[J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2018, 34(21): 2546-2549, 2553.
- [16] ZENG H P, CHEN H, CHEN D, et al. Binding characteristics of plasma protein in active parts of Daidai lipid-lowering flavonoid extract[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44(9): 1911-1920.
- [17] WANG S S, SONG Y, CHENG B. Study on the determination method of plasma protein binding rate of sulfamethoxazole in *Oreochromis niloticus*[J]. Freshwater Fisheries(淡水渔业), 2018, 48(6): 53-60.
- [18] HAN Y X, WANG W, TAN R Q, et al. Determination of plasma protein binding rate of arctiin and arctigenin with ultrafiltration[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38(3): 143-145.
- [19] LI D Y. Pharmacological basis and research progress of drug and plasma protein binding[J]. Biol Chem Eng(生物化工), 2017, 3(1): 67-69.
- [20] WANG C, WANG R, XIE H, et al. Effect of aminophylline on physiological and pathological changes in acute exposure to high altitude in rats[J]. J Central South Univ: Med Sci(中南大学学报: 医学版), 2015, 40(1): 39-45.
- [21] 倪娟, 王力甚. 缺血修饰白蛋白临床研究进展[J]. 现代医学, 2017(45): 615-618.
- [22] WU J, CHEN H, WU J H, et al. Determination of the plasma protein binding rates of pirfenidone to human and rats[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2018, 27(22): 2636-2640.

收稿日期: 2021-04-11

(本文责编: 陈怡心)