

· 药物动力学研究 ·

高效液相色谱-超滤法测定常氧及缺氧大鼠血浆中毛蕊花糖苷的蛋白结合率

王维刚^{1,2,3}, 王芄^{1,2,3}, 李晓琳^{2,3}, 王俊丽⁴, 刘天龙^{2,3}, 陈升富^{1,2,3}, 李茂星^{1,2,3,5}, 阳志强^{2,5} (1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 联勤保障部队第九四〇医院临床药学科, 甘肃 兰州 730050; 3. 甘肃省药学行业技术中心, 甘肃 兰州 730050; 4. 西宁联勤保障中心药品仪器监督检验站, 甘肃 兰州 730050; 5. 西北民族大学化工学院, 甘肃 兰州 730124)

摘要: 目的 建立毛蕊花糖苷血浆蛋白结合率的测定方法, 比较常氧及缺氧大鼠血浆中毛蕊花糖苷蛋白结合率的异同。方法 将大鼠置于低压低氧动物实验舱中, 于海拔 7 500 m 下缺氧暴露 3 d 制备缺氧大鼠模型。采用超滤法处理样品, 结合高效液相色谱(HPLC)法测定常氧及缺氧大鼠血浆中毛蕊花糖苷游离型药物浓度(C_f)和总药物浓度(C_t), 并考察超滤膜非特异性结合率(NSB), 对 C_f 进行矫正后, 计算血浆蛋白结合率。结果 大鼠血浆中毛蕊花糖苷浓度为 3、6、12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 毛蕊花糖苷与常氧大鼠血浆的蛋白结合率分别为 (62.02±8.51)%、(60.17±5.59)% 和 (62.60±3.77)%; 与缺氧大鼠血浆的蛋白结合率分别为 (32.79±4.20)%、(33.16±1.74)% 和 (32.72±2.20)%, 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 毛蕊花糖苷与常氧大鼠血浆蛋白属于中强度结合, 且在研究的浓度范围内, 不具浓度依赖性, 而毛蕊花糖苷与缺氧大鼠血浆蛋白结合强度明显低于常氧大鼠血浆。

关键词: 毛蕊花糖苷; 高效液相色谱-超滤法; 常氧; 缺氧; 血浆蛋白结合率; 大鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)12-1839-06

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.12.014

Determination of Plasma Protein Binding Rate of Verbascoside in Normoxic and Hypoxic Rats by HPLC-ultrafiltration Method

WANG Weigang^{1,2,3}, WANG Peng^{1,2,3}, LI Xiaolin^{2,3}, WANG Junli⁴, LIU Tianlong^{2,3}, CHEN Shengfu^{1,2,3}, LI Maoxing^{1,2,3,5}, YANG Zhiqiang^{2,5} (1. School of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000 Gansu, China; 2. Department of Clinical Pharmacy, The 940th Hospital of Joint Logistic Support Force of PLA, Lanzhou 730050 Gansu, China; 3. Gansu Plateau Pharmaceutical Technology Center, Lanzhou 730050 Gansu, China; 4. Drug and Instrument Supervisory & Test Station, Xining Joint Logistics Support Center, Lanzhou 730050 Gansu, China; 5. School of Chemical Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730124 Gansu, China)

Abstract: Objective To establish a method for determination of plasma protein binding rate of verbascoside, and compare the difference of plasma protein binding rate in normoxic and hypoxic rats. **Methods** The rats were placed in a low-pressure and hypoxic animal experiment chamber, and hypoxic rat models were prepared by exposure to

收稿日期: 2021-05-13

作者简介: 王维刚, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理与毒理学研究。Email: wangweigangxgg@163.com。通信作者: 李茂星, 男, 主任药师, 硕士研究生导师, 研究方向: 高原军事药学。Email: limaox2020@aliyun.com。

基金项目: 甘肃省重点研发计划项目(20YF3FA035); 甘肃省卫生行业科研计划项目(GSWSKY2020-41); 九四〇医院青年培育项目(2021yxky060); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(31920200010); 九四〇医院“新冠肺炎(COVID-19)”应急医学科研项目(20yjky018)。

hypoxia at altitude of 7 500 m for 3 days. The samples were processed by ultrafiltration and the HPLC method was used to determine verbascosides in the plasma of normoxic and hypoxic rats, to obtain free drug concentration (C_f) and total drug concentration (C_t); the ultrafiltration membrane non-specific binding rate (NSB) was also investigated. After correction for C_f , the plasma protein binding rate was calculated according to the traditional formula of ultrafiltration. **Results** When the concentrations of verbascoside in rat plasma was 3, 6 and 12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the plasma protein binding rates of verbascoside with normoxic rats were $(62.02 \pm 8.51)\%$, $(60.17 \pm 5.59)\%$, and $(62.60 \pm 3.77)\%$; and the plasma protein binding rates with hypoxic rats were $(32.79 \pm 4.20)\%$, $(33.16 \pm 1.74)\%$, and $(32.72 \pm 2.20)\%$. The difference of the plasma protein binding rate was significant between the normoxic and hypoxic rats ($P < 0.05$). **Conclusion** The plasma protein binding of verbascoside in normoxic rats is moderate, and there is no concentration-dependence within the concentration range of the study. The binding intensity of verbascoside to plasma protein in hypoxic rats is obvious lower than that in normoxia rats.

Keywords: Verbascoide; HPLC-ultrafiltration; normoxia; hypoxia; plasma protein binding; rates

毛蕊花糖苷, 又名麦角甾苷、毛蕊花苷、类叶升麻苷, 是苯乙醇苷类代表性化合物, 广泛存在于列当科、玄参科、木兰科、唇形科等多种双子叶植物中^[1], 是肉苁蓉、马先蒿、熟地黄和车前子等药用植物的指标性成分^[2-3]。其具有抗氧化、抗炎、神经保护和抗肿瘤等多种药理活性, 还可抗缺氧、抗运动疲劳, 并通过 PI3K/Akt/mTOR-HIF-1 α 信号通路保护高原缺氧引起的认知功能损伤、改善高原缺氧记忆损伤^[4-6]。药物的血浆蛋白结合率是药动学重要参数之一, 不仅与药物在体内的分布、代谢和排泄等密切相关, 而且影响药效和药理机制^[7]。而缺氧条件可引起药物与血浆蛋白结合率的改变, 如泼尼松龙的血浆蛋白结合率升高^[8], 哌替啶的血浆蛋白结合率下降^[9]。目前尚未见超滤法进行毛蕊花糖苷血浆蛋白结合率的报道。本研究参考文献方法^[9-13], 建立 HPLC-超滤法测定毛蕊花糖苷血浆蛋白结合率的方法, 对毛蕊花糖苷血浆蛋白结合率以及缺氧对其结合率的影响进行研究, 为毛蕊花糖苷的临床用药及新药研发提供参考。

1 材料

1.1 试剂 毛蕊花糖苷(纯度 $\geq 98\%$, 成都普瑞法科技开发有限公司, 批号: PS000683); 色谱纯乙腈(瑞典 OCEANPAK 公司, 批号: 20100310G202); 灭菌注射用水(四川科伦药业股份有限公司, 批号: M20080903B); 色谱纯乙酸乙酯(四川科伦药业股份有限公司, 批号: 2020102201); PBS 磷酸盐缓冲液(美国 HyClone 公司)。

1.2 仪器 Ultimate 3000 DGLC 型高效液相色谱仪

(美国 Thermo Fisher 公司); Millipore 10 kDa 型超滤管(美国 Millipore 公司); FLYDWC50-II C 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, 离心半径为 8.1 cm(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 万分之一电子天平(德国赛多利斯有限公司)。

1.3 动物 SPF 级 Wistar 大鼠, 雄性, 体质量 200~250 g, 中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院动物实验科, 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%。以标准饲料喂养, 自由饮水。

2 方法与结果

2.1 大鼠血浆收集 将 12 只雄性 Wistar 大鼠随机分为毛蕊花糖苷常氧组和毛蕊花糖苷缺氧组, 每组 6 只。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。常氧及缺氧大鼠经眼眶静脉采血, 置于肝素钠抗凝的离心管, 以 $4\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离血浆备用。

2.2 色谱条件 色谱柱: Thermo C₁₈(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 程序梯度洗脱; 柱温: 30 $^\circ\text{C}$; 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

Table 1 Gradient elution program

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~12	12→30	88→70
12~20	30→95	70→5
20~25	12	88

2.3 溶液的配制

2.3.1 对照品储备液 精密称取毛蕊花糖苷对照品 0.002 0 g 于 10 mL 容量瓶, 甲醇定容至刻度, 制成毛蕊花糖苷质量浓度为 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。

2.3.2 工作液 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 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的毛蕊花糖苷工作液(即用即配)。

2.3.3 质控样品溶液 取低、中、高毛蕊花糖苷工作液, 分别加入大鼠空白血浆和超滤液配制质量浓度为 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 取毛蕊花糖苷样品工作液, 加入常氧及缺氧大鼠空白血浆进行稀释, 涡旋混匀, 分别得到毛蕊花糖苷低、中、高剂量(3、6、12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 血浆样品, 样品孵育及预处理后, 进行 HPLC 测定。

2.4.2 超滤液样品 超滤管的预处理: 吸取 12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 毛蕊花糖苷工作液 250 μL 于超滤管中, 在 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 10 min, 重复两次, 使超滤膜

对毛蕊花糖苷进行预吸附。经预吸附处理的超滤管中加入低、中、高浓度的血浆样品, 在 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 10 min, 重复两次, 进行平衡处理。

超滤液样品的制备: 分别将低、中、高剂量(3、6、12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 血浆样品置于经预处理的超滤管中, 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。

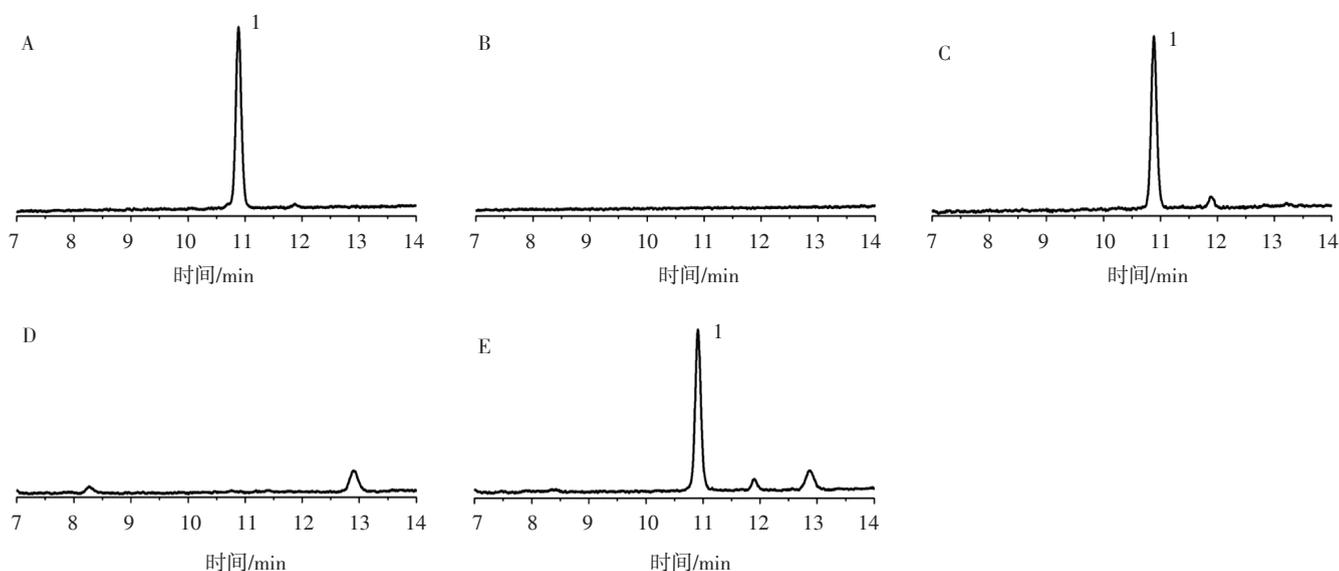
2.5 血浆样品预处理 取 50 μL 血浆样品, 加入 400 μL 乙酸乙酯, 涡旋 5 min 混匀, 以 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min。取乙酸乙酯层于 1.5 mL 离心管中, 重复萃取两次, 37 $^{\circ}\text{C}$ 离心浓缩仪挥干。加入 50 μL 初始流动相复溶, 以 15 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液进行 HPLC 分析。

2.6 方法学考察

2.6.1 专属性 将空白血浆、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, 毛蕊花糖苷在 10.8 min 左右出峰, 峰形良好, 血浆样品和超滤液均无杂峰干扰。见图 1。

2.6.2 线性关系考察

2.6.2.1 血浆标准曲线 精密吸取毛蕊花糖苷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“2.5”项下方法预处理后进行 HPLC 分析。以待测物峰面积



A. 毛蕊花糖苷对照品; B. 空白血浆; C. 血浆样品; D. 空白超滤液; E. 超滤液样品。1. 毛蕊花糖苷

图 1 毛蕊花糖苷的高效液相色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of verbascoside

(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: $Y=0.119\ 0X-0.019\ 8(r=0.999\ 6)$, 线性范围为 $0.2\sim 20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 表明在线性范围内线性关系良好。

2.6.2.2 超滤液标准曲线 精密吸取毛蕊花糖苷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: $Y=0.171\ 7X+0.024\ 6(r=0.998\ 7)$, 线性范围为 $0.2\sim 20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 表明在线性范围内线性关系良好。

2.6.3 精密度和准确度试验 取低、中、高浓度血浆及超滤液质控样品, 血浆样品按“2.5”项下方法进行预处理并测定。日内连续进样6次, 计算日内精密密度; 连续测定3d计算日间精密密度。并根据标准曲线测定质控样品浓度, 考察方法准确度。结果见表2。血浆及超滤液样品日内精密密度和日间精密密度的RSD均小于5%, 准确度在 $(95.52\pm 3.83)\%\sim(101.22\pm 4.99)\%$ 之间, 表明精密密度及准确度良好。

表2 血浆及超滤液样品毛蕊花糖苷的精密密度及准确度($n=6, \bar{x}\pm s$)

Table 2 Precisions and accuracies of verbascoside in plasma and ultrafiltrate samples($n=6, \bar{x}\pm s$)

样品	理论浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	精密密度(RSD)/%		准确度/%
		日内	日间	
血浆	3	2.49	3.40	96.82 ± 2.41
	6	1.33	4.22	96.45 ± 1.42
	12	4.25	1.91	95.52 ± 3.83
超滤液	3	4.20	3.91	98.46 ± 4.13
	6	4.47	2.35	101.22 ± 4.99
	12	0.98	4.29	96.58 ± 0.32

2.6.4 回收率试验 分别取 3 、 6 、 $12\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的毛蕊花糖苷血浆样品及超滤液质控样品, 其中血浆样品按“2.5”项下方法操作, 进样分析, 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“2.5”项下方法操作, 浓缩仪挥干后, 残渣分别用含 3 、 6 、 $12\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 毛蕊花糖苷的初始流动相复溶, 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计算血浆及超滤液样品方法回收率。结果见表3。

2.6.5 稳定性试验 取毛蕊花糖苷低、中、高浓度的血浆样品及超滤液质控样品, 其中血浆样品按“2.5”项下方法处理, 超滤液不做处理。分别于室温

表3 血浆及超滤液样品毛蕊花糖苷的回收率及基质效应($\bar{x}\pm s, \%; n=5$)

Table 3 Recoveries and matrix effects of verbascoside in plasma and ultrafiltrate samples($\bar{x}\pm s, \%; n=5$)

加入浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	血浆		超滤液
	提取回收率	方法回收率	方法回收率
3	83.02 ± 1.04	95.74 ± 3.25	98.05 ± 2.23
6	81.18 ± 0.41	96.41 ± 1.06	99.35 ± 5.29
12	84.24 ± 0.70	98.93 ± 1.82	99.06 ± 4.25

$[(18\pm 2)\text{ }^\circ\text{C}]$ 放置 0 、 0.5 、 $1\ \text{h}$ 和 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 放置 0 、 2 、 $4\ \text{h}$ 后进样分析。结果见表4。血浆及超滤液样品在室温和 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下 RSD 均小于 10% , 表明在所考察时间及温度范围内稳定性良好。

表4 血浆及超滤液样品毛蕊花糖苷的稳定性($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Stabilities of verbascoside in plasma and ultrafiltrate samples($\bar{x}\pm s, n=3$)

样品	理论浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	室温		$4\text{ }^\circ\text{C}$	
		准确度/%	RSD/%	准确度/%	RSD/%
血浆	3	96.09 ± 0.29	2.38	98.47 ± 4.53	4.60
	6	95.76 ± 1.26	1.32	96.21 ± 3.13	3.25
	12	98.93 ± 1.82	1.84	96.23 ± 4.05	4.20
超滤液	3	98.87 ± 5.36	5.42	101.03 ± 3.51	3.47
	6	99.35 ± 5.28	5.32	101.79 ± 1.78	1.75
	12	95.00 ± 1.49	1.57	95.38 ± 1.87	1.96

2.7 血浆蛋白结合率

2.7.1 超滤膜非特异性结合研究 取毛蕊花糖苷储备液适量, 用 PBS 稀释得到浓度为 3 、 6 、 $12\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的毛蕊花糖苷缓冲液。分取 $50\ \mu\text{L}$ 于内插管进样分析, 另取 $250\ \mu\text{L}$ 于经预处理的超滤离心管中, 置于低温离心机中以 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 超速离心 $10\ \text{min}$, 测定滤液中毛蕊花糖苷的浓度。依据缓冲液浓度(C_{pre})及滤液中浓度(C_{post}), 计算超滤膜非特异性结合率(NSB), $\text{NSB}=(C_{\text{pre}}-C_{\text{post}})/C_{\text{pre}}\times 100\%$ 。结果见表5。结果在 3 、 6 、 $12\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下, NSB 分别为 $(34.95\pm 2.32)\%$ 、 $(34.70\pm 1.08)\%$ 和 $(34.10\pm 1.09)\%$, 平均 NSB 为 $(34.58\pm 0.43)\%$ ($n=4$)。结果表明, 超滤

表5 超滤膜对毛蕊花糖苷的非特异性吸附作用($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 5 Non-specific adsorption of verbascoside by ultrafiltration membrane($\bar{x}\pm s, n=5$)

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	2.70 ± 0.16	1.76 ± 0.06	34.95 ± 2.32
6	5.31 ± 0.41	3.47 ± 0.06	34.70 ± 1.08
12	11.33 ± 0.72	7.51 ± 0.19	34.10 ± 1.09

管滤膜对毛蕊花糖苷有较大的吸附作用，因此毛蕊花糖苷的血浆蛋白结合率计算公式要进行校正。

2.7.2 血浆蛋白结合率测定 分别将毛蕊花糖苷低、中、高浓度(3、6、12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的血浆样品置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育 40 min。取 250 μL 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，进样测定。取 50 μL 含药血浆，按

“2.5”项下方法处理后进样测定。检测超滤液及血浆中毛蕊花糖苷的浓度，依据超滤装置对游离药物吸附性结果求算毛蕊花糖苷的游离总浓度(C_f)。 $C_f=C_{f\text{测}}/(1-\text{NSB})$ ，其中 $C_{f\text{测}}$ 为实测游离浓度。用以下公式计算毛蕊花糖苷与血浆蛋白结合率(PPB)： $\text{PPB}=(C_t-C_f)/C_t\times 100\%$ ，其中 C_t 为毛蕊花糖苷血浆总浓度。结果见表 6。

表 6 毛蕊花糖苷与常氧及缺氧大鼠血浆蛋白结合率($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Plasma protein binding rates of verbascoside in normoxia and hypoxia rats($\bar{x}\pm s, n=6$)

加入浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	常氧			缺氧		
	$C_f/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$C_t/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	PPB/%	$C_f/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$C_t/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	PPB/%
3	2.81 \pm 0.06	1.06 \pm 0.31	62.02 \pm 8.51	2.68 \pm 0.14	2.16 \pm 0.57	32.79 \pm 4.20*
6	5.37 \pm 0.45	2.67 \pm 0.36	60.17 \pm 5.59	5.56 \pm 0.48	3.86 \pm 0.99	33.16 \pm 1.74*
12	11.04 \pm 1.28	4.36 \pm 0.61	62.60 \pm 3.77	11.97 \pm 0.81	7.24 \pm 1.86	32.72 \pm 2.20*

注：与常氧组比较，* $P<0.05$

3 讨论

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，只有另一部分游离型的药物才能发挥药效作用。血浆蛋白结合率作为药动学主要参数，直接关系到对药物在体内的分布、代谢、排泄以及药效的发挥，已广泛应用于新药开发过程中临床试验前研究^[14-15]。血浆蛋白结合率的常用测定方法有平衡透析法和超滤法。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，且易受血浆和缓冲液 pH 值和 Gibbs-Donnan 效应等因素的影响^[15]。超滤法简便快速，通常几十分钟内即可收集超滤液进行游离浓度的测定，可用于不稳定的药物血浆蛋白结合率的测定。本研究采用超滤法测定毛蕊花糖苷在大鼠血浆中的蛋白结合率，考察了毛蕊花糖苷生物样品在室温及 4 $^{\circ}\text{C}$ 下的稳定时间，结果毛蕊花糖苷生物样品在室温 1 h 和 4 $^{\circ}\text{C}$ 4 h 内保持稳定，可满足实验的要求。

超滤条件的优化：药物主要与血浆中白蛋白结合，白蛋白分子量为 66.3 kDa，选择常用的截留分子量为 10 kDa 的超滤离心管可满足测定要求。在此基础上设转速为 6 000、8 000、10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ，离心 10 min，考察离心力对超滤液得率的影响，发现随着离心力的增大，超滤液回收率升高，因此选择转速为 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。在该选定转速下，设离心时间为

10、15、20 min，考察离心时间对超滤液得率的影响，发现虽然随着离心时间的延长，超滤液得率也有所升高，但变化幅度不大，为了节约时间及减少样品的分解，选用离心时间为 10 min。

孵育时间的选择：将装有药物浓度为 3、6、12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ EP 管于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅孵育，分别于 40、120、180 min 取样超滤，测定超滤前后的药物浓度，结果 3 个浓度下，40、120 min 测得浓度均基本一致，故选择 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床震荡 40 min。

本研究结果表明，在考察的质量浓度范围内，毛蕊花糖苷与常氧及缺氧大鼠的血浆蛋白结合率均无浓度依赖性，其平均结合率分别为 61.60% 和 32.97%。与常氧大鼠相比，毛蕊花糖苷与缺氧大鼠血浆蛋白结合率降低了 28.63%，表明毛蕊花糖苷与常氧大鼠血浆蛋白具有中强度的结合。缺氧状态下，机体微环境的改变可能是引起血浆蛋白结合率变化的原因。当药物血浆蛋白结合率降低时，血液中游离态的药物浓度升高，导致其更容易向组织内分布，更易透过血脑屏障，使脑中药物浓度升高，从而提高药效^[16-17]。此外，缺氧条件下血浆蛋白结合率的改变还可能引起其代谢和排泄的变化。本实验重点测定了毛蕊花糖苷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，也为毛蕊花糖苷作为抗缺氧新药的研发提供了参考。

参考文献:

- [1] 朱玉婷, 李茂星, 王建, 等. 中压柱层析快速分离纯化肉苁蓉提取物中的松果菊苷和毛蕊花糖苷[J]. 解放军药理学学报, 2018, 34(6): 491-493.
- [2] GONG W, ZHANG N, CHENG G, et al. *Rehmannia glutinosa* libosch extracts prevent bone loss and architectural deterioration and enhance osteoblastic bone formation by regulating the IGF-1/PI3K/mTOR pathway in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(16): 175-184.
- [3] 王维刚, 王芑, 阳志强, 等. 毛蕊花糖苷药理作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47(12): 1078-1087.
- [4] 朱玉婷. 苯乙醇苷类化合物对高原作业效能的改善及机制研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2019.
- [5] LI M, ZHU Y, LI J, et al. Effect and mechanism of verbascoside on hypoxic memory injury in plateau[J]. *Phytotherapy Research*, 2019, 33(10): 2692-2701.
- [6] 王建, 李晓琳, 李茂星, 等. 苯乙醇苷类化合物通过PI3K/Akt/mTOR-HIF-1 α 信号通路对高原低氧大鼠认知功能损伤的保护作用[J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47(12): 1137-1145.
- [7] 李丹, 邱全玉, 孙振刚, 等. 芒果苷在糖尿病大鼠和正常大鼠血浆中蛋白结合率的比较[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(3): 342-346.
- [8] GAI M N, CHAVEZ J, RITSCHEL W A, et al. Pharmacokinetics of prednisolone in man during acute and chronic exposure to high altitude[J]. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2005, 43(2): 85-91.
- [9] 李天娇, 王颖, 苑博, 等. 超滤法结合高效液相色谱法测定多种属血浆中坦西莫司的血浆蛋白结合率[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(19): 3122-3125.
- [10] 陈爱瑛, 董文彬, 程敏, 等. HPLC测定人血浆中舒尼替尼浓度及其血浆蛋白结合率[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(1): 57-59.
- [11] 曾华平, 陈红, 陈丹, 等. 玳玳果黄酮降脂提取物效应组分血浆蛋白结合特性研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(9): 1911-1920.
- [12] 廖凯道, 孙业伟, 于沛, 等. 校正超滤法测定川芎嗪硝酮衍生物MPI-01的血浆蛋白结合率[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(16): 1890-1894.
- [13] 李晓天, 褚延乐, 吴凤娟, 等. 超滤法测定冬凌草乙素的血浆蛋白结合率[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(20): 2418-2422.
- [14] VOLPP M, HOLZGRABE U. Determination of plasma protein binding for sympathomimetic drugs by means of ultrafiltration[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 127(15): 175-184.
- [15] 王绚, 许静, 张永. 超滤法结合UPLC测定抗601合剂中黄芩苷、绿原酸在不同血浆中的蛋白结合率[J]. 药物评价研究, 2018, 41(5): 794-798.
- [16] 胡绍英. 丹参酚酸体内代谢规律及其穿透血脑屏障特性研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [17] 曹晖. 血液稀释对丙泊酚药代动力学与中枢药物浓度以及靶控输注的影响[D]. 上海: 复旦大学, 2003.

(编辑: 梁进权)