

# Study on Plasma Stability and Protein Binding of Dihydro Oleanolic Acid by High Performance Liquid Chromatography

Rui Chen, Ling Mi, Jin Cai, Gaofeng Zhu, Lei Tang, Jing Huang\*

Guizhou Medcial University, Guizhou Guiyang

Email: zhangyi19800611@163.com, 464268222@qq.com, \*1104849720@qq.com

Received: Feb. 28<sup>th</sup>, 2018; accepted: Mar. 14<sup>th</sup>, 2018; published: Mar. 21<sup>st</sup>, 2018

## Abstract

**Objective:** To determine the stability of dihydrogen oleanolic acid in rat plasma as well as the plasma protein binding rate in order to provide the basis for the development of clinical research on dihydro oleanolic acid. **Methods:** The HPLC method was used to detect the binding of dihydrogen oleanolic acid to rat plasma proteins by ultrafiltration. **Results:** Dihydro-oleanolic acid showed good plasma stability when the concentration of dihydroxyaluminum in rat plasma was 1 - 20 µg/ml, while plasma protein binding rate was high and concentration-independent in rats. **Conclusion:** The established ultrafiltration method can meet the requirement of determination of plasma protein binding rate. The established HPLC method meets the requirement of dihydromyric acid assay *in vitro*.

## Keywords

Dihydro Oleanolic Acid, Plasma Stability, Plasma Protein Binding Rate, Ultrafiltration Method

# 高效液相色谱法研究二氢齐墩果酸的 血浆稳定性与蛋白结合率

陈 瑞, 糜 玲, 蔡 进, 朱高峰, 汤 磊, 黄 静\*

贵州医科大学, 贵阳 贵州

Email: zhangyi19800611@163.com, 464268222@qq.com, \*1104849720@qq.com

收稿日期: 2018年2月28日; 录用日期: 2018年3月14日; 发布日期: 2018年3月21日

\*通讯作者。

**文章引用:** 陈瑞, 糜玲, 蔡进, 朱高峰, 汤磊, 黄静. 高效液相色谱法研究二氢齐墩果酸的血浆稳定性与蛋白结合率[J]. 自然科学, 2018, 6(2): 126-131. DOI: 10.12677/ojns.2018.62019

## 摘要

目的：高效液相色谱法测定二氢齐墩果酸在大鼠血浆中的稳定性以及血浆蛋白结合率，以期为二氢齐墩果酸的临床药物开发研究提供依据并建立出相应检测方法。方法：以高效液相为检测手段，采用超滤法考察二氢齐墩果酸与大鼠血浆蛋白的结合情况。结果：二氢齐墩果酸在大鼠血浆中质量浓度为1~20  $\mu\text{g/ml}$ 时，血浆稳定性好，大鼠血浆蛋白结合率较高且无浓度依赖性。结论：建立的超滤法能够满足血浆蛋白结合率测定的要求，建立的高效液相检测方法满足二氢齐墩果酸的体外试验检测。

## 关键词

二氢齐墩果酸，血浆稳定性，血浆蛋白结合率，超滤法

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

齐墩果酸(Oleanolic acid, OA)是具有保肝护肾、抑制血小板凝集、降血脂、降糖、抗癌、抗应激、抗微生物等作用的一类五环三萜类化合物[1] [2]。前期课题组抗糖尿病药物研究中发现将齐墩果酸双键还原的衍生物二氢齐墩果酸，具有较强的促葡萄糖消耗活性，是一个值得开展深入研究的化合物。在化合物开发的过程中，所测定的血浆稳定性以及血浆蛋白结合率是前期研究基础，药物吸收入血后只有游离型的药物能从血液进入作用部位发挥药理作用，而结合型的药物则无药理活性，游离型药物的浓度与药物的药效学、毒理学过程密切相关[3] [4] [5]。本实验采用超滤法测定二氢齐墩果酸与大鼠血浆中的蛋白结合率[6] [7] [8]，为二氢齐墩果酸的有效应用及测试方法的研究提供一定的理论依据。对于处于开发阶段的化合物二氢齐墩果酸，及早地预测和评估血浆稳定性以及血浆蛋白结合是有一定现实意义的[9] [10]。

## 2. 材料

### 2.1. 仪器

高效液相色谱仪(型号 Waters e2695, 美国沃特世公司); 漩涡混合器(型号 XH-B, 江苏康健医疗用品有限公司); 氮气吹扫仪(型号 JN300-2, 苏州吉米诺仪器有限公司)高速离心机(GENESPEED 型号 X1, Gene Company Limited)超声波清洗器(型号 KH-600E, 昆山禾创超声仪器有限公司); 十万分之一电子天平(型号 FA805N, 上海菁海仪器有限公司)超低温保存箱(型号: DW-86L486, Haier)。

### 2.2. 药品与试剂

二氢齐墩果酸(贵州医科大学药物化学重点实验室制备, 经高效液相色谱鉴定纯度大于 98%); 乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯)均购自德国 Merck 公司; 水为屈臣氏超纯水[11]。

### 2.3. 动物

清洁级 SD 大鼠 6 只, ♂, 体质量 200~250 g, 鼠龄: 12~14 周, 大鼠购自重庆腾鑫比尔实验动物销售有限公司, 合格证号: SCXK(渝)2012-0011 [11]。

### 3. 方法与结果

#### 3.1. 色谱条件

色谱柱: Waters Symmetry C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)柱; 保护柱: Waters Symmetry C<sub>18</sub> (5 μm Van Guard Cartridge 3.9 mm × 5 mm) [11]; 流速 1 ml/min; 波长: 210 nm; 柱温: 40°C; 流动相: 甲醇(A)-0.1% 甲酸水(B)等度洗脱(A: 90, B: 10), 采集时间: 25 min。此高效液相色谱条件下采集样品时如图 1 所示二氢齐墩果酸与血浆空白基质分开, 分离性良好, 二氢齐墩果酸出峰时间为 11.79 min。

#### 3.2. 对照品储备液的配制

精密称取 10.0 mg 二氢齐墩果酸对照品以甲醇溶解并定容至 5 ml, 制备成质量浓度为 2 mg/ml 的二氢齐墩果酸对照品贮备液, 4°C 贮藏。

#### 3.3. 样品预处理

##### 3.3.1. 血浆采集

取清洁级 SD 雄性大鼠 6 只股动脉采血分别置于以肝素钠溶液涂抹过的离心管中, 3000 \*g 离心 10 min 离心温度 4°C, 取上层血浆-80°C 冷冻保存。

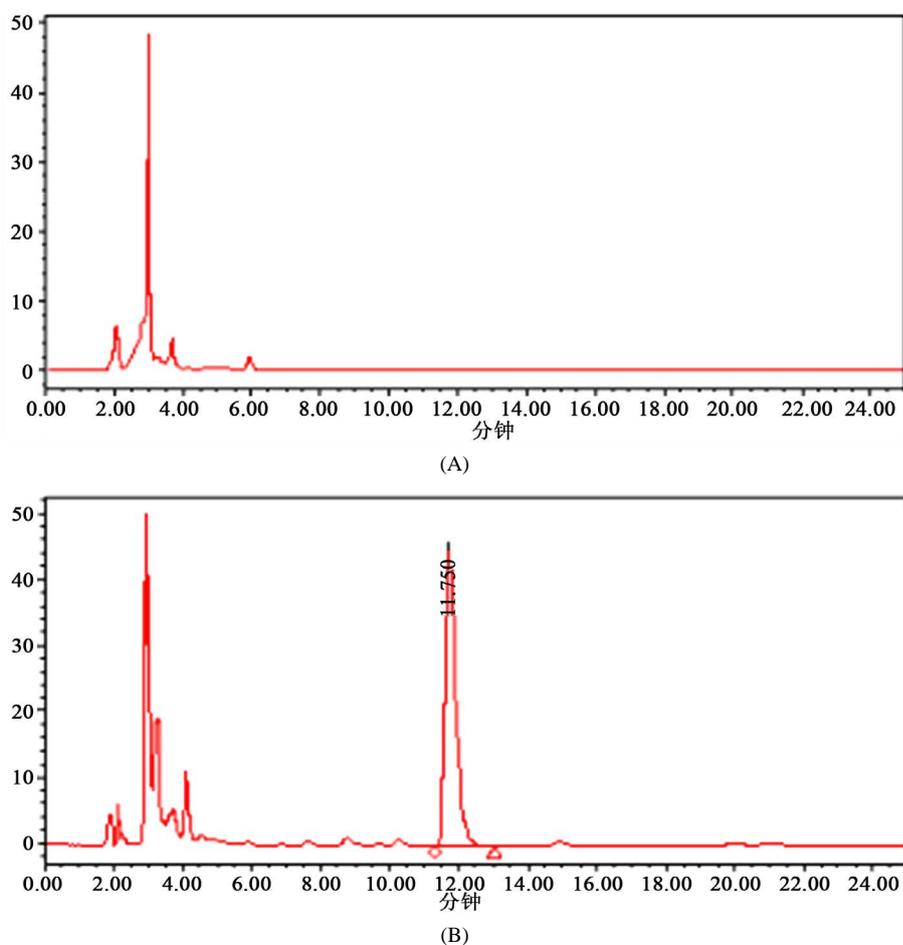


Figure 1. (A) Blank plasma; (B) Blank plasma with dihydro oleanolic acid

图 1. (A) 空白血浆; (B) 空白血浆与二氢齐墩果酸

### 3.3.2. 血浆样品处理[11]

取 100  $\mu\text{l}$  血浆样品, 加入 400  $\mu\text{l}$  甲醇, 涡旋混合 5 min, 12,000  $\times g$  离心 10 min 离心温度 4 $^{\circ}\text{C}$ , 吸取上层有机层, 氮气吹干, 残渣加入 100  $\mu\text{l}$  甲醇溶解, 12,000  $\times g$  离心 10 min 离心温度 4 $^{\circ}\text{C}$ , 取上层清液待测。

### 3.4. 标准曲线的制备

在空白血浆加入二氢齐墩果酸对照储备液, 配制成 1、2、5、10、20、40  $\mu\text{g/ml}$  的系列溶液, 按“血浆样品处理”方法操作。以样品质量浓度为横坐标(X), 样品峰面积比值为纵坐标(Y), 用加权最小二乘法加权进行回归计算[11], 权重系数为(1/X), 得线性回归方程  $Y = 2382.6X + 593.32$  ( $r^2 = 0.9988$ )。结果表明在测定范围内, 线性关系良好。

### 3.5. 精密度试验

制备高中低 3 个不同浓度的二氢齐墩果酸对照品血浆溶液(其中含二氢齐墩果酸质量浓度分别为 2、10、20  $\mu\text{g/ml}$ ), 按“2.3.1”项下方法处理后, 同日内进样 5 次以测定日内精密度, 连续进样 3 d 以测定日间精密度[11]。结果表明, 低、中、高质量浓度的血浆样品的日内 RSD 分别为 6.34%、4.03%、5.72%, 日间 RSD 分别为 6.68%、4.5%、8.23%。

### 3.6. 血浆稳定性试验

向 EP 管中加入大鼠空白血浆 100  $\mu\text{l}$ , 分别加入质控样品工作液 1  $\mu\text{l}$  使二氢齐墩果酸质量浓度分别为 5、10 和 20  $\mu\text{g/ml}$  (重复 3 份, 含醇量为 1%), 振荡混合后在室温下放置 0、15、30、60、120、180 min, 加甲醇终止反应, 按“血浆样品处理”项处理后进行 HPLC 分析, 用随行标准曲线计算相应的药物浓度[11]。二氢齐墩果酸低、中、高三个浓度在 SD 大鼠血浆中百分剩余率均不低于 80%, 表明稳定性良好, 结果如图 2。

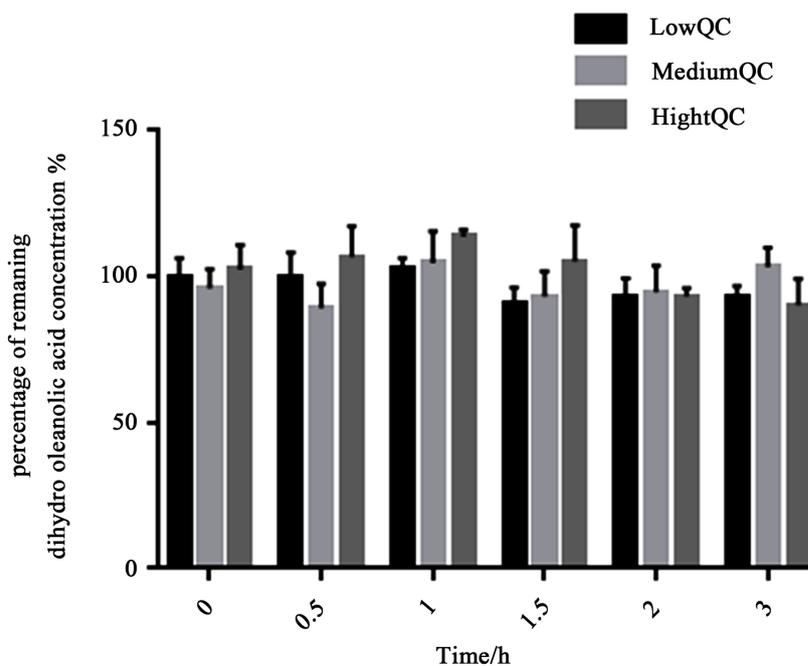


Figure 2. Stability of dihydro oleanolic acid in rat plasma

图 2. 二氢齐墩果酸在大鼠血浆中的稳定性

**Table 1.** The protein binding rates of 3 kinds of dihydro oleanolic acid in specie of plasma ( $n = 5$ )**表 1.** 3 种质量浓度二氢齐墩果酸在大鼠血浆中的蛋白结合率( $n = 5$ )

检测物	低质量浓度蛋白结合率%	中质量浓度蛋白结合率%	高质量浓度蛋白结合率%
二氢齐墩果酸	72.86 ± 3.43	75.83 ± 5.31	77.31 ± 4.56

### 3.7. 血浆蛋白结合率试验[11]

取 SD 大鼠血浆分别加入适量二氢齐墩果酸对照品溶液, 涡旋混匀, 制备成质量浓度为 5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$  的二氢齐墩果酸血浆样品, 在恒温振荡器中 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 30 min。将 500  $\mu\text{l}$  血浆样品装入 Millipore 10 K 超滤管中, 2000 \*g 离心 25 min 制备超滤液, 测定游离的二氢齐墩果酸含量, 离心过程控制温度在 4 $^{\circ}\text{C}$  条件下。另外吸取 100  $\mu\text{l}$  的二氢齐墩果酸血浆样品, 按“2.4”项下方法前处理血浆样品液和超滤液, 按上述色谱条件进样测定, 记录色谱图, 测定其中药物总量。计算血浆样品液和超滤液中二氢齐墩果酸的含量: 总浓度为 Dt, 游离浓度 Df, 蛋白结合率(%) =  $[(\text{Dt} - \text{Df})/\text{Dt}] \times 100\%$  [11]。二氢齐墩果酸低、中、高三个浓度在 SD 大鼠血浆中的蛋白结合率处于中等水平(72.86%~77.31%)。二氢齐墩果酸在大鼠血浆中的蛋白结合率见表 1。

## 4. 讨论

通过在体外与血浆一起孵化, 能够快速确定一种化合物在血浆中是否易降解及其降解程度。本试验确定了二氢齐墩果酸在血浆中稳定性良好, 保证了该化合物在进入血液循环后的稳定性。测定快速是超滤法的优点, 通常几十分钟即可收集到足够供测定的血浆超滤液。理论上, 高血浆蛋白结合率的药物临床使用容易产生安全性问题。而本研究显示二氢齐墩果酸的血浆蛋白结合率不超过 80%, 说明其由于血浆蛋白结合率改变而导致游离浓度急剧升高所产生不良反应的可能性不大。

## 基金项目

贵州省普通高等学校药物化学工程研究中心建设项目(黔教合 KY 字[2014]219); 贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心项目(黔科合[2016]平台人才 5402); 贵州省联合基金项目(黔科合 LH 字[2015]7340、[2016]7379); 贵州省科技支撑计划(黔科合支撑[2017]2839)。

## 参考文献

- [1] 唐初, 陈玉, 柏舜, 等. 齐墩果酸的结构修饰与生物活性研究进展[J]. 有机化学, 2013, 33(1): 46-65.
- [2] 曲正义, 刘宏群, 郑培和, 等. 齐墩果酸型皂苷药理活性研究[J]. 中成药, 2012, 34(6): 1143-1147.
- [3] 刘鹏, 陈莹. HPLC-超滤法测定雷公藤红素与家兔、大鼠、人血浆的蛋白结合率[J]. 中国药房, 2015, 26(1): 62-65.
- [4] 黄勇, 陈慧, 何峰, 等. 平衡透析法研究荜苈及其制剂的人血浆蛋白结合率[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(21): 1708-1713.
- [5] 陈莹, 蔡爽. 超滤法测定冬凌草甲素的血浆蛋白结合率[J]. 中国医药导报, 2013, 10(16): 25-27.
- [6] 高秀蓉, 蒋学华, 王婷. HPLC 法测定蝙蝠葛碱与大鼠和人血浆蛋白的结合率[J]. 中国药房, 2011, 22(31): 2894-2897.
- [7] 吴阳, 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): 57-59.
- [8] 贺春晖, 赵懿清, 李霞, 等. 齐墩果酸药理作用的分子机制研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(12): 1419-1423.
- [9] Ettmayer, P., Amidon, G.L., et al. (2004) Lessons Learned from Marketed and Investigational Prodrugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47, 2393-2404. <https://doi.org/10.1021/jm0303812>

- 
- [10] Skonberg, C., Olsen, J., Madsen, K.G., *et al.* (2008) Metabolic Activation of Arboxylic Acids. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **4**, 425-438. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.4.425>
- [11] 王建塔, 糜玲, 陈瑞, 等. 液质联用技术测定益母草碱的血浆蛋白结合率[J]. 广州化工, 2017, 45(13): 114-116.

**知网检索的两种方式:**

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2330-1724, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [ojs@hanspub.org](mailto:ojs@hanspub.org)