齐墩果酸在人血浆蛋白和血清白蛋白中结合率的测定

张 弘, 张晖芬, 常会超, 韩 笑, 毕开顺, 陈晓辉*

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

关键词: 齐墩果酸; 蛋白结合率; LC-MS; 平衡透析法

中图分类号: R917 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870 (2011) 02-0243-04

Determination of protein binding rate of oleanolic acid in human plasma and serum albumin

ZHANG Hong, ZHANG Hui-fen, CHANG Hui-chao, HAN Xiao, BI Kai-shun, CHEN Xiao-hui[1]

(*School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China*)

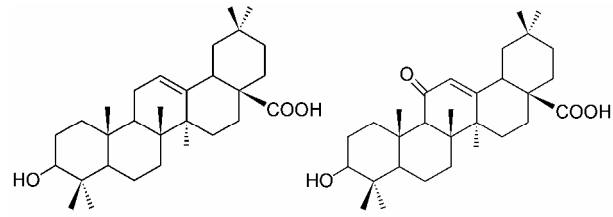
Abstract: A LC-MS method was established for the determination of the protein binding rates of oleanolic acid in human plasma and serum albumin. The equilibrium dialysis combined with LC-MS to determine the total concentration in plasma and free drug concentration of oleanolic acid was carried out. The human plasma protein binding rates of oleanolic acid at three concentrations were 79.6%, 81.9% and 63.3%, respectively. The human serum albumin protein binding rates of oleanolic acid at three concentrations were 53.5%, 56.6% and 47.7%, respectively. The method is shown to be simple, accurate, sensitive and specific for the determination of biological samples. The protein binding rates in human plasma and serum albumin were of high strength.

Key words: oleanolic acid; protein binding rate; LC-MS; equilibrium dialysis

齐墩果酸 (oleanolic acid, OA) 又名庆四素 (图1), 系五环三萜类化合物, 以游离或结合成苷的形式广泛存在于白花蛇舌草、山楂、丁香、大枣、女贞子、枇杷叶、橡木和夏枯草等植物中。临床上主要用于急性病毒性肝炎、慢性肝炎和肝硬化的治疗[1]。目前, 对齐墩果酸在动物体内药物动力学研究和蛋白结合率的报道较少, 仅有文献[2]报道齐墩果酸在大鼠血浆中的蛋白结合率, 在人血浆蛋白和血清白蛋白中的结合率未见报道。血浆蛋白结合率是影响药物在体内的分布、排泄、代谢和消除半衰期的重要参数, 与药物药理作用关系密切。本文采用平衡透析法测定齐墩果酸在人血浆蛋白、人血清白蛋白中的蛋白结合率, 为药物的开发与应用提供参考。

收稿日期: 2010-06-25.

*通讯作者 Tel: 86-24-23843711-3380,
E-mail: cxh_syphu@yahoo.com.cn



A B

Figure 1 The chemical structures of oleanolic acid (A) and internal standard glycyrrhetinic acid (B)

材料与方法

仪器 岛津 2010 液质联用仪, 包括 LC-10ATvp 输液泵、2010EV 型单重四级杆质谱仪 (APCI 源); HPLC/MS Solution 3.0 工作站 (日本岛津公司); 透析袋 (MD-25kD, 莱博科贸有限公司)。

试药与试剂 齐墩果酸对照品批号: 110709-200505 (中国药品生物制品鉴定所); 内标甘草次酸对照品批号: 110723-200612 (中国药品生物制品鉴定

所); 人血清白蛋白含量: 96%～99% (美国 Sigma 公司, A1653); 空白人血浆 (辽宁中医药大学附属第二医院提供)。

色谱条件　色谱柱: Kromasil C_{18} (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 预柱: C_{18} 保护柱; 流动相: 甲醇-水-氨水 (72∶28∶0.1); 流速: 0.8 mL·min^{-1}; 进样量: 20 μL。

质谱条件　大气压化学电离源 (APCI), 脱溶剂管 (CDL) 温度: 200 ℃; 加热块温度: 200 ℃; 雾化气 (N_2) 流速 2.5 L·min^{-1}; 检测电压: 1.75 kV。负离子方式检测: 扫描方式为选择离子监测 (SIM)。齐墩果酸和内标的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 响应最强且较稳定, 因此将其作为定量分析的检测离子。齐墩果酸的检测离子为 $[M-H]^-$, *m*/*z* 455.25; 内标甘草次酸的检测离子为 $[M-H]^-$, *m*/*z* 469.30。

溶液的配制

空白透析液　称取磷酸氢二钾 14.11 g、磷酸二氢钾 2.59 g 和氯化钠 1.99 g 置 1 L 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 得 pH 7.4 磷酸盐缓冲液[3]。

对照品系列溶液　精密称取齐墩果酸对照品 10.01 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成齐墩果酸储备液 (100.0 μg·mL^{-1})。用甲醇逐级稀释得浓度为 10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、500.0 和 1 000.0 ng·mL^{-1} 的对照品系列溶液, 于 4 ℃保存备用。

内标溶液配制　精密称取甘草次酸对照品 9.98 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成内标储备液 (99.8 μg·mL^{-1})。精密量取内标储备液 0.4 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇-水 (80∶20) 稀释至刻度, 摇匀, 即为内标溶液 (399.2 ng·mL^{-1})。

人血清白蛋白配制　精密称取人血清白蛋白 0.875 g, 置 25 mL 量瓶中, 用空白透析液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成 35 mg·mL^{-1} 的人血清白蛋白溶液, 待用。

血浆样品处理方法　取透析内 (外) 液 1 mL, 依次加入甲醇 100 μL, 内标溶液 100 μL, 涡旋混合 15 s, 加入乙醚 4 mL, 涡旋混合 5 min, 离心 (3 200 r·min^{-1}) 5 min, 取上清液置另一试管中, 于 35 ℃空气流下吹干, 残渣加流动相 100 μL, 超声溶解 3 min, 涡旋混合 2 min, 转移至 EP 管中, 离心 (12 000 r·min^{-1}) 5 min, 取上清液 20 μL 进样分析。

标准曲线的制备　取空白血浆 (或空白透析液) 1 mL, 加入齐墩果酸系列溶液 100 μL, 配制成浓度相当于 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 和 100.0 ng·mL^{-1} 的血浆样品, 按照“血浆样品处理方法” (除不加甲醇外) 项下处理, 以齐墩果酸与内标的峰面积比 (A/A_{IS}) 为纵坐标, 齐墩果酸的浓度 (C) 为横坐标, 做加权回归曲线, 分别得透析内液和透析外液的标准曲线。

准确度与精密度　取空白血浆 (或空白透析液) 1 mL, 按“标准曲线的制备”项下方法操作, 配制成低、中、高 3 个浓度的样品溶液 (透析内液: 2.5、40.0 和 80.0 ng·mL^{-1} 齐墩果酸的模拟血浆样品; 透析外液: 2.0、10.0 和 40.0 ng·mL^{-1} 齐墩果酸的模拟透析液样品), 每个浓度连续测定 3 天, 并根据当日标准曲线计算血浆样品的浓度, 考察方法的准确度与精密度。

提取回收率　按“准确度与精密度”项下配制低、中、高等 3 个浓度的样品溶液, 同时另取空白血浆 (或空白透析液) 1 mL, 除不加齐墩果酸对照品系列溶液和内标溶液外, 其他按“血浆样品处理方法”项下操作, 向获得的上清液中加入相应浓度的齐墩果酸对照品溶液 100 μL 和内标溶液 100 μL, 涡旋混合, 于 35 ℃空气流吹干, 以 100 μL 流动相溶解后进样分析, 获得相应峰面积 (3 次测定的平均值), 以每一浓度 2 种处理方法的峰面积比值计算提取回收率。

稳定性考察　分别考察模拟血浆样品和模拟透析液样品于 −20 ℃冻藏 7 天和预处理后室温放置 4 h 的稳定性。将 3 个浓度的含药透析液置于 37 ℃放置 12 h 取样 1 mL, 分析测定, 考察齐墩果酸缓冲盐溶液在实验条件下的稳定性。

平衡透析实验方法　将经空白透析液浸泡后的透析袋一端折叠用线结扎, 将 2 mL 空白血浆 (空白人血清白蛋白溶液) 加入透析袋, 透析袋内留一小段空气泡, 再将透析袋另一端扎紧, 使其悬浮于盛有 20 mL 透析外液的广口瓶中, 调整透析袋高度, 使内外液面保持同一水平, 并避免透析袋贴壁。透析外液齐墩果酸的浓度分别为 40.0、60.0 和 80.0 ng·mL^{-1}, 将该广口瓶于 37 ℃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[4]。

平衡时间的确定　定量转移含药的透析液 20 mL 于广口瓶中, 分别于 4、6、8、10、12 和 24 h 结束实验 (每浓度点三样本), 分别测定透析袋内、外齐墩果酸浓度, 计算其血浆蛋白结合率。结果显示, 10 h 后透析达到平衡。

透析袋的吸附作用　将透析袋内加入空白透析液 (设体积为 v_1) 2 mL, 将其放入盛有 20 mL (设体积

为 v_2) 药物浓度为 c_A 的含药透析液的广口瓶中, 37 ℃恒温放置 10 h 至其平衡, 测定透析袋外药物浓度 c_E, 透析膜对药物的吸附率 X 用下式计算[5]: $X = [c_A \times v_2 - c_E \times (v_1+v_2)]/c_A \times v_2$。结果表明, 透析膜对药物有微量吸附, 平均吸附率为 2.91%, 对测试结果没有显著影响。

结果

1　方法的专属性

在本色谱条件下, 内标物 (甘草次酸) 的保留时间为 3.4 min, 齐墩果酸的保留时间为 5.9 min, 内源性物质不干扰齐墩果酸和内标物的测定, 色谱图如图 2 和图 3 所示。

2　标准曲线的制备

透析内液的回归方程为: $Y=7.0\times10^{-2}X-3.2\times10^{-2}$, $r = 0.9936$ ($n = 7$)。根据标准曲线, 齐墩果酸在 1.0～100.0 ng·mL^{-1} 内线性关系良好, 方法的定量下限为 1.0 ng·mL^{-1}。

透析外液的回归方程为: $Y=7.8\times10^{-2}X-1.6\times10^{-2}$, $r = 0.998\ 1$ ($n = 6$)。根据标准曲线, 齐墩果酸在 1.0～50.0 ng·mL^{-1} 内线性关系良好, 方法的定量下限为 1.0 ng·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) 和准确度 (RE) 见表 1。

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

	Concentration /ng·mL^{-1}	RE/%	RSD/%	
			Intra-day	Inter-day
A	2.5	0.8	6.4	12.5
	40	−3.6	5.2	13.6
	80	−1.2	4.9	7.2
B	2	1.8	9.4	5.4
	10	1.7	3.7	7.1
	40	−4.9	8.3	11.2

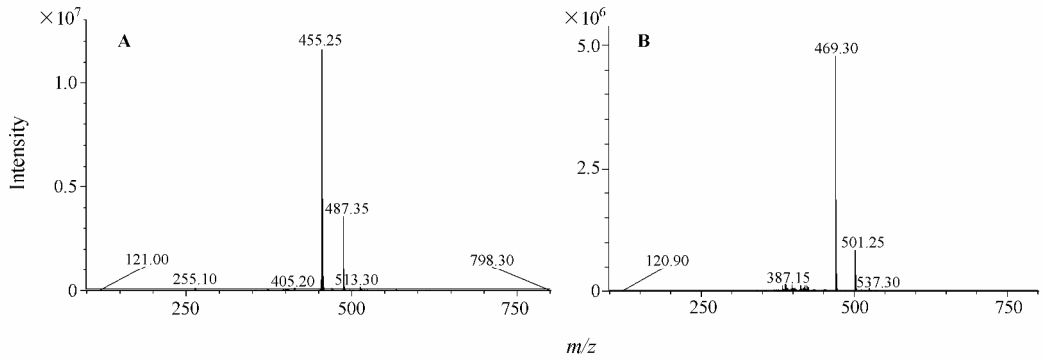


Figure 2　Mass spectrograms of oleanolic acid (A) and glycyrrhetinic acid (internal standard, B)

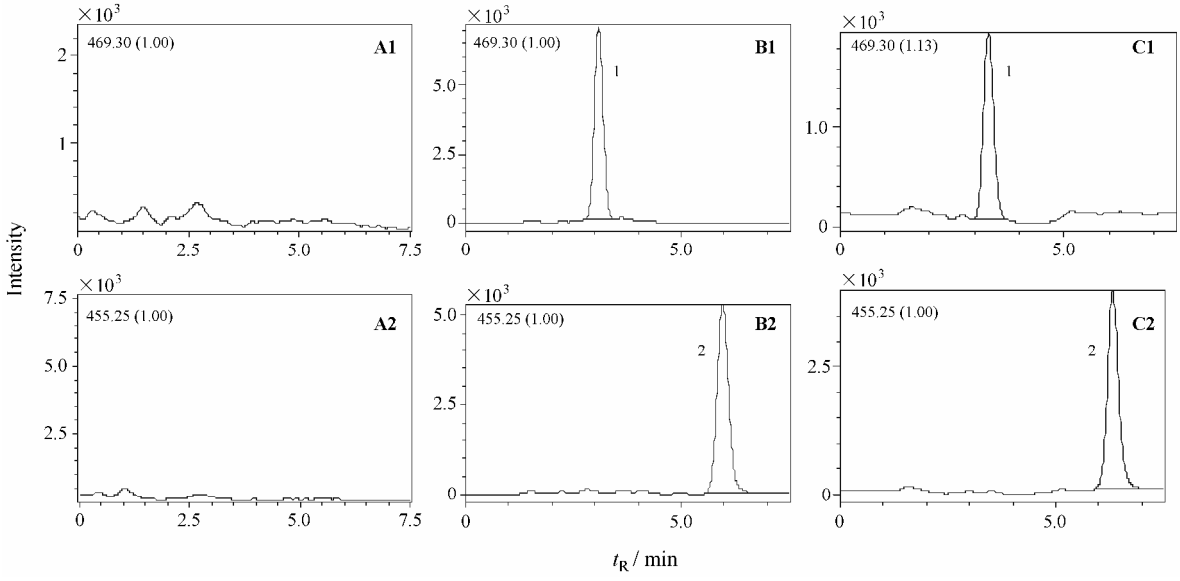


Figure 3　LC-MS chromatograms of the plasma.　A: Blank plasma; B: Blank plasma spiked with oleanolic acid and internal standard; C: The sample in the dialysis membrane.　Peak 1: Oleanolic acid; 2: Glycyrrhetinic acid

4　提取回收率与稳定性

3 种浓度下齐墩果酸提取回收率: 透析内液分别为 82.5% ± 3.7%、80.2% ± 9.6%和 78.2% ± 3.8%, 同样方法测定内标提取回收率为 89.2% ± 3.8%; 透析外液分别为 86.6% ± 9.0%、80.8% ± 11.1%和 89.7% ± 9.7%, 内标提取回收率为 99.4% ± 9.0%。考察结果表明, 透析内液、透析外液样品在室温放置 4 h 和 −20 ℃下放置一周的条件下稳定性良好, 透析外液样品在 37 ℃恒温放置 12 h 稳定性良好。

5　血浆蛋白结合率的测定

按照“平衡透析实验方法”项下操作, 低、中、高 3 个浓度每个浓度 3 样本分析, 于 10 h 结束实验, 测定袋内、外齐墩果酸的浓度, 计算其血浆蛋白结合率。齐墩果酸在人血浆、人血清白蛋白中的蛋白结合率的测定结果见表 2。

Table 2　Protein binding rates in human plasma and HSA at three concentration levels.　$n = 3$, $\bar{x} \pm s$

Item	Protein binding rates		
	40 ng·mL^{-1}	60 ng·mL^{-1}	80 ng·mL^{-1}
Human plasma	79.6% ± 6.9%	81.9% ± 4.7%	63.3% ± 1.9%
HSA	53.5% ± 6.2%	56.6% ± 4.3%	47.7% ± 5.7%

讨论

药物在体内主要与白蛋白、α-酸性糖蛋白、脂蛋白等结合, 大多数的酸性药物主要与白蛋白结合[6]。齐墩果酸作为酸性药物, 在体内应该主要与白蛋白结合, 本研究结果表明, 低、中、高 3 个浓度的人血浆蛋白结合率分别为 79.6%、81.9%和 63.3%; 与人血清白蛋白结合率分别为 53.5%、56.6%和 47.7%, 进一步验证齐墩果酸在体内主要与白蛋白结合。齐墩果酸在正常人体内生理浓度下的蛋白结合率为 80% 左右, 属于蛋白结合率较高的药物, 因此, 推测齐墩果酸在体内半衰期很长。有文献[6]报道齐墩果酸胶囊人口服半衰期为 8.7 h, 与推测相符。经过 SPSS 16.0 统计软件分析可以得出, 高浓度时血浆蛋白结合率有显著降低趋势, 可能是由于药物在血浆中与蛋白结合具有一定的饱和性[7], 故当血浆中药物浓度升高到一定程度时, 齐墩果酸与蛋白的结合位点已经饱和, 使人血浆中游离型药物浓度增加, 从而导致血浆蛋白结合率降低。

齐墩果酸属于蛋白结合率较高的药物, 且当药物浓度增大到一定程度时, 蛋白结合率呈现显著的下降趋势, 因此, 在临床用药时一定要严格控制用药剂量, 尤其是当机体的某些组织发生病变时, 以免出现不良反应。

本研究建立了平衡透析法和 LC-MS 法测定人血浆蛋白结合率, 方法灵敏度高、操作简单, 具有较好的回收率和重现性, 能够满足临床上生物样品分析的要求。

References

[1] Wong Q, Lu PZ. Research progress of oleanolic acid [J]. China Pharm (中国药房), 2008, 19: 711−712.

[2] Guo X, Cheng ZN, Cao W, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of oleanolic acid in rats [J]. Chin J Hosp Pharm (中国医院药学杂志), 2008, 28: 599−602.

[3] Woo E, Greenblatt DJ. Pharmacokinetic and clinical implications of quinidine protein binding [J]. J Pharm Sci, 1979, 68: 466−470.

[4] Jing CJ, Chen XH, Liu X, et al. Determination of the binding rate of rat plasma protein with salvianolic acid B [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2010, 45: 343−346.

[5] Lu LC, Jiang XH, Yang JY, et al. The effects of Amoxicillin on plasma protein-binding rate of glimepiride [J]. West China J Pharm Sci (华西药学杂志), 2003, 18: 246−250.

[6] Song M, Hang TJ, Wang Y, et al. Determination of oleanolic acid in human plasma and study of its pharmacokinetics in Chinese healthy male volunteers by HPLC tandem mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 40: 190−196.

[7] Liang WQ. Biopharmaceutics and Pharmacokinetics (生物药剂学) [M]. 2nd ed. Beijing: People’s Medical Press, 2003: 94−98.