

Study on Stability of Dihydro Oleanolic Acid in Artificial Gastric Fluid and Intestinal Fluid by High Performance Liquid Chromatography

Rui Chen, Ling Mi, Li Zhang, Gaofeng Zhu, Lei Tang, Jing Huang*

Guizhou Medical University, Guiyang Guizhou
Email: 464268222@qq.com, *1104849720@qq.com

Received: Mar. 23rd, 2018; accepted: Apr. 16th, 2018; published: Apr. 23rd, 2018

Abstract

The stability of Dihydro Oleanolic Acid in Artificial Gastrointestinal Fluid is studied by High Performance Liquid Chromatography. Dihydrogen oleanolic acid solution was added to artificial gastric juice (pH 2), artificial intestinal fluid (pH 6.8) and artificial gastric juice without pepsin, artificial intestinal juice without pancreatin, and then samples were taken periodically to measure dihydrogen at different times. The results showed that the content of dihydro oleanolic acid in the four solutions did not change significantly with the extension of time; the remaining percentage were 85% - 115%, indicating that dihydro-oleanolic acid in the artificial stomach, intestinal fluid are more stable. The establishment of HPLC detection method can meet the determination of artificial gastric juice and intestinal fluid stability requirements.

Keywords

HPLC, Dihydro Oleanolic Acid, Artificial Gastric Juice, Artificial Intestinal Juice, Stability, Digestive Enzymes

高效液相色谱法研究二氢齐墩果酸在人工胃液和肠液中的稳定性

陈瑞, 糜玲, 张丽, 朱高峰, 汤磊, 黄静*

贵州医科大学, 贵州 贵阳
Email: 464268222@qq.com, *1104849720@qq.com

*通讯作者。

收稿日期: 2018年3月23日; 录用日期: 2018年4月16日; 发布日期: 2018年4月23日

摘要

高效液相色谱法研究测定二氢齐墩果酸在人工胃肠液中的稳定性。取二氢齐墩果酸溶液分别加入到人工胃液(pH 2)、人工肠液(pH 6.8)和未加胃蛋白酶的人工胃液、未加胰酶的人工肠液中, 定时取样, 测定不同时间内二氢齐墩果酸含量。结果发现, 二氢齐墩果酸在4种溶液中的含量随时间的延长并没有明显改变, 百分剩余率均在85%~115%, 表明二氢齐墩果酸在人工胃、肠液中均比较稳定。建立的高效液相色谱检测方法能够满足测定人工胃液和肠液中稳定性的要求。

关键词

高效液相, 二氢齐墩果酸, 人工胃液, 人工肠液, 稳定性, 消化酶类

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、降血脂、降糖、抗微生物等作用的一类五环三萜类化合物[1] [2]。二氢齐墩果酸作为齐墩果酸双键还原的衍生物, 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。为了确保化合物在发现的各个阶段都能成功, 化合物在溶液及胃肠道的稳定性是需考察的因素之一[3] [4]。所以对二氢齐墩果酸在体外模拟人工胃肠液中的稳定性进行研究具有一定的意义, 而对其在人工胃肠液中的稳定性未见报道, 高效液相色谱方法具有选择性好, 检测灵敏度高, 操作自动化, 重复性良好等优点故本实验利用高效液相色谱法测定了二氢齐墩果酸该化合物在空白人工胃肠液及人工胃液和肠液中的稳定性, 为二氢齐墩果酸的吸收机制及后期该化合物的开发提供参考, 及建立了研究该化合物的高效液相色谱检测方法。

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

胰蛋白酶(批号 513H041), 北京索莱宝科技有限公司; 胃蛋白酶(批号 1104C034), 北京索莱宝科技有限公司; 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。

2.3. 胃、肠液的配制

2.3.1. 人工胃液的配制

按《中国药典》(2015版)中第四部,取 16.4 mL 稀盐酸,加 800 mL 水与 10 g 胃蛋白酶,摇匀使其充分溶解后,调节 pH 值至 1.3,加水稀释定容至 1000 mL,即为人工胃液[5][6][7]。

2.3.2. 人工肠液的配制

按《中国药典》(2015版)中第四部,取 6.8 g 磷酸二氢钾,加 500 mL 水使其溶解,0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.8;另称取 10 g 胰蛋白酶加适量水溶解,将两液混合后,加水定容至 1000 mL,即为人工肠液[5][6][7]。

3. 方法与结果

3.1. 色谱条件

色谱柱: Waters Symmetry C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)柱; 保护柱: Waters Symmetry C₁₈ (5 μm VanGuard Cartridge 3.9 mm × 5 mm); 流速 1 ml/min; 柱温: 40°C; 检测波长 210 nm; 流动相: 甲醇(A) 0.1% 甲酸水(B)等度洗脱(A: 90, B: 10)。

3.2. 溶液的配制

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. 样品处理

取 200 μL 孵育样品,加 400 μL 甲醇终止反应,涡旋混合 5 min,12,000*g 离心 10 min,吸取上层液体,氮气吹干,加入 200 μL 甲醇溶解,12,000*g 离心 10 min,离心温度 4°C,取上层清液待测。

3.4. 标准曲线的制备

将二氢齐墩果酸储备液配制成 0.5、1、5、10、20、40 μg/mL 的系列溶液,将二氢齐墩果酸质量浓度为横坐标(X),其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,权重系数为(1/X),得线性回归方程 $Y = 2395.2X + 763.57(r^2 = 0.9995)$ 。结果表明在 0.5~40 μg/mL 测定范围内,线性关系良好。

3.5. 精密度试验

制备高、中、低不同质量浓度(2, 10, 20 μg/mL)的二氢齐墩果酸溶液,同日内进样 5 次考察日内精密度,连续进样 3 d 考察日间精密度[8]。结果表明,低、中、高质量浓度的血浆样品的日内 RSD 分别为 2.84%、2.03%、1.42%,日间 RSD 分别为 5.68%、4.51%、4.36%。

3.6. 二氢齐墩果酸在人工胃肠液中的稳定性试验

分别精密取 50 μL 已配置的低、中、高供试品溶液于 5 mL ep 管中,分别加入空白人工胃肠液以及模拟人工胃肠液稀释至刻度是含醇量为 1%,分别用 ep 管分装 200 μL,每个样平行 3 次,于水浴 37°C 下考察其稳定性,分别于 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 h 精密取样加 400 μL 甲醇终止反应,再 12,000*g 高速离心 10 min,按 2.1 项下的色谱条件进行测定,记录其峰面积,实验重复 3 次,结果如图 1 所示。

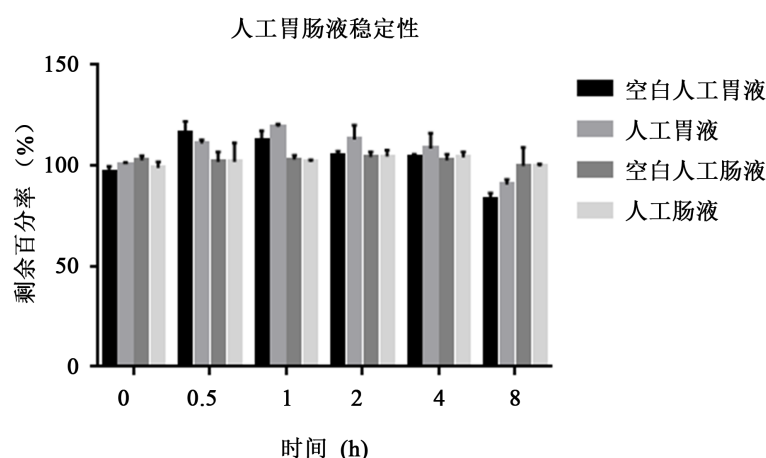


Figure 1. Stability of dihydro oleanolic acid in artificial gastrointestinal solution
图 1. 二氢齐墩果酸在人工胃肠液中的稳定性

4. 讨论

稳定性是化合物开发成药的一项重要内容,尤其是口服后药物在胃、肠道中的稳定性,直接影响药物在胃、肠道吸收入血前的有效性[5]。本实验结果进一步说明,二氢齐墩果酸在模拟人工胃肠液中具有较好的稳定性,但由于人的体内环境非常的复杂,药物进入体内后会受到多种因素的影响,如酶的种类等,本试验中仅考察了胃蛋白酶与胰酶的影响。因此,该试验仅能在一定程度上表明二氢齐墩果酸的稳定性。胃肠道是药物代谢转化的重要场所,模拟人工胃肠液作为体外模型,虽不能完全代表体内消化情况,但在一定程度上表明化合物的稳定性有其研究价值。

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,杨光忠. 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,姚春林,王英平. 齐墩果酸型皂苷药理活性研究[J]. 中成药, 2012, 34(6): 1143-1147.
- [3] 马平. HPLC 法测定西咪替丁注射液中西咪替丁的含量[J]. 药物生物技术, 2016, 23(3): 238-240.
- [4] 薛凤锐. 奥美拉唑与西咪替丁在应激性胃溃疡患者治疗中的应用效果[J]. 中国药物经济学, 2015, 10(2): 95-96.
- [5] 张毅,张丽,蔡进,汤磊. 西咪替丁在人工模拟胃肠液的稳定性研究[J]. 广州化工, 2017, 45(20): 65-67, 105.
- [6] 黄财顺,李宝才,向诚. 人工胃肠液模型在药物稳定性研究中的应用现状[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(10): 1836-1841.
- [7] 曹伟,冀思华,刘芳,等. 鼠尾草酸在人工体液中的稳定性考察[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(3): 444-448.
- [8] 王建塔,糜玲,陈瑞,汤磊. 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：2161-8712，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：acm@hanspub.org