

HPLC 法测定苜蓿素的表观油水分配系数*

张锐 施旻 刘建群 熊韶光 徐彭**

(江西中医学院 南昌 330004)

摘要 目的: 测定苜蓿素在正辛醇-水和正辛醇-缓冲液体系中的表观油水分配系数。方法: 采用 HPLC 法测定苜蓿素的浓度, 使用 Hypersil ODS 色谱柱(5 μm 4.6 mm $\times$ 200 mm), 以甲醇-水(65:35)为流动相, 流速为 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, 检测波长 270 nm, 摇瓶法测定苜蓿素的表观油水分配系数。结果: 苜蓿素的表观油水分配系数 $\log P = 1.66$ 。结论: 以 HPLC 法测定苜蓿素的表观油水分配系数简便、快捷。

关键词: 禾本科植物; 苜蓿素; 表观油水分配系数; 高效液相色谱法; 药物剂型; 药理学

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)09-1815-03

HPLC determination of apparent *n*-octanol/water partition coefficient of tricin*

ZHANG Rui SHI Min LIU Jian-qun XIONG Shao-guang XU Peng**

(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract Objective: To determine the *n*-octanol-water/buffer solution systems partition coefficient of tricin by HPLC. **Methods:** An HPLC method was established to detect the concentration of tricin. The Hypersil ODS(5 μm , 4.6 mm $\times$ 200 mm) column was adopted, the mobile phase was methanol-water(65:35) at the flow rate of 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹ and the detection wavelength was 270 nm. The partition coefficients for the *n*-octanol/water solution systems of tricin were determined by shaking flask method. **Result:** $\log P$ of tricin was 1.66. **Conclusion:** The HPLC method is simple and rapid to determine the oil-water partition coefficient of tricin.

Key words: gramineous plant; tricin; apparent *n*-octanol/water partition coefficient; HPLC; pharmaceutical dosage form; pharmacokinetics

苜蓿素(tricin)是禾本科植物特征性成分^[1,2], 具有很好的生理活性^[3]。其在空间上为平板结构(图1), 分子堆砌紧密; 在 5,7,4' 位有 3 个酚羟基, 可形成分子间氢键, 晶格的排列和氢键的形成使得苜蓿素的分子间作用力增大, 这是使其熔点高、脂溶性和水溶性均较差的重要原因。苜蓿素的表观油水分配系数预测值可通过 ChemDraw 软件计算得出为 1.65, 但实测值未见文献报道, 本研究用 HPLC 法实测了苜蓿素在正辛醇-水和正辛醇-磷酸盐缓冲液中的表观分配系数, 以期苜蓿素剂型研制及药动学研究提供依据。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪: Agilent 1200(美国 Agilent 公司); QYC-200 全温空气摇床(上海福玛实验设备

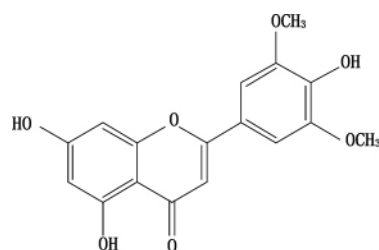


图1 苜蓿素结构

Fig 1 The structure of tricin

有限公司); TGL-16C 台式离心机(上海安亭科学仪器厂); Sartorius BP211D 型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)。ChemDraw Ultra 10.0 (Cambridge-Soft Corporation)。

苜蓿素(自制, 纯度 $\geq 98\%$)^[6]; 甲醇为色谱纯, 正辛醇($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$)为分析纯, 水为双蒸馏水并经

* 国家自然科学基金资助项目(项目批准号: 30660220)

** 通讯作者 Tel: 13970941297; E-mail: xp0420@163.com

0.22 μm 水系滤膜过滤。

2 色谱条件

参考文献[7]的色谱条件,并略作调整。色谱柱: Hypersil ODS(5 μm , 4.6 mm $\times$ 200 mm); 流动相: 甲醇-水(65:35), 流速为 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹; 紫外检测波长: 270 nm; 柱温: 室温; 进样量: 10 μL 。在上述色谱条件下, 苜蓿素的保留时间为 4 min, 色谱峰理论塔板数大于 3500, 采用外标法计算浓度。色谱图见图 2。

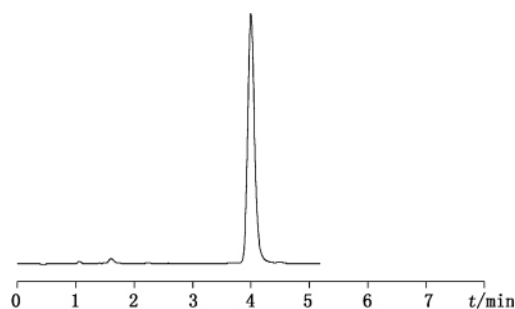


图2 苜蓿素的色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of tricin

3 溶液的制备

精密称量苜蓿素 5.0 mg 于 50 mL 量瓶中, 以水饱和的正辛醇为溶剂超声溶解并定容, 制成浓度为 0.1 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的储备液。

pH 2.5 ~ 7.8 的磷酸盐缓冲液: 按中国药典 2010 年版二部附录 XVD 缓冲液的配制方法, 配制 pH 分别为 2.5, 5.0, 5.8, 6.8, 7.4, 7.8 的磷酸盐缓冲液。

pH 1.2 的磷酸盐缓冲液: 取磷酸二氢钾 100 g, 加水 800 mL, 用盐酸调节 pH 至 1.2, 用水稀释至 1000 mL。

4 方法学考察

4.1 线性关系考察 精密量取上述苜蓿素储备液 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成不同浓度的溶液。分别精密吸取上述不同浓度的溶液各 10 μL 进样测定, 记录峰面积。以进样量(μg) 为横坐标, 以峰面积积分值为纵坐标进行线性回归, 得回归方程:

$$Y = 1.486 \times 10^3 X - 4.32 \quad r = 0.9999$$

苜蓿素进样量在 0.108 ~ 1.08 μg 之间线性关系良好。

4.2 精密度试验 精密吸取浓度为 0.05 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的溶液 10 μL , 在同样的条件下连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算 RSD 为 1.1%。试验结

果表明精密度良好。

4.3 稳定性试验 精密吸取浓度为 0.05 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的溶液于配制后 0, 2, 4, 8, 12, 24, 36 h 各进样 10 μL , 测定峰面积, 计算 RSD 为 1.6%。结果表明苜蓿素溶液在 36 h 内基本稳定。

5 表观油水分配系数的测定

精密量取浓度为 0.1 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的苜蓿素储备液 1 mL 共 7 份, 分别置于具塞塑料管中, 再分别加入被正辛醇饱和的水及 pH 1.2, 2.5, 5.0, 5.8, 6.8, 7.4, 7.8 的磷酸盐缓冲液各 5 mL, 放入振荡器中, 温度保持 (37 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$, 振摇 24 h 直至平衡, 以 3000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 10 min, 取上层正辛醇溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪, 记录峰面积; 取 0.1 mg $\cdot$ mL⁻¹ 的对照品溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 记录峰面积。按外标法计算苜蓿素浓度。进而计算分配系数, 计算公式如下:

$$C_w = (C_1 - C_o) \times V_o / V_w$$

$$P_{\text{app}} = C_o / C_w$$

上式中 P_{app} 为苜蓿素的表观油水分配系数; C_1 为苜蓿素在正辛醇中的初始浓度, 即储备液浓 0.1 mg $\cdot$ mL⁻¹; V_o 为被水饱和的正辛醇体积 (即 1 mL); C_w 为药物分配平衡时在水相中测得的苜蓿素浓度 (mg $\cdot$ mL⁻¹), V_w 为水相体积 (即 5 mL)。

苜蓿素在正辛醇-水中的分配系数为 45.8 (log $P = 1.66$)。在不同 pH 的溶液中表观油水分配系数见表 1。

表 1 表观油水分配系数计算结果 ($n = 3$)

Tab 1 The results of partition coefficient

溶剂(solvent)		P	$\log P$
正辛醇-水(n - octanol/ water)		45. 8	1. 66
磷酸盐缓冲液(buffer phosphate)	pH 1. 2	67. 7	1. 83
磷酸盐缓冲液(buffer phosphate)	pH 2. 5	64. 3	1. 81
磷酸盐缓冲液(buffer phosphate)	pH 5. 0	60. 7	1. 78
磷酸盐缓冲液(buffer phosphate)	pH 5. 8	60. 1	1. 78
磷酸盐缓冲液(buffer phosphate)	pH 6. 8	52. 4	1. 71
磷酸盐缓冲液(buffer phosphate)	pH 7. 4	49. 9	1. 70

6 讨论

6.1 在预实验中发现苜蓿素在碱性条件下不稳定, 可能是由于其分子结构中酚羟基的存在引起的。经考察该药在酸性及 pH 小于 8 的磷酸盐缓冲液中 25 $^{\circ}\text{C}$ 均可稳定放置 72 h, 继续升高溶液的 pH 则该药的稳定性明显下降, 故作者只考察该药在 pH 8 以下缓冲液中的油水分配系数。

6.2 油水分配系数的测定有摇瓶法、产生柱法和反相高效液相色谱法。产生柱法测定步骤较多,达平衡时间过长,而反相高效液相色谱法需要用一系列已知 P 值的同系物来建立标准曲线,成本高,故而选用经典的摇瓶法来测定苜蓿素的油水分配系数,即 $\log P = 1.66$,该法操作简便,通过化学软件 ChemDraw 10.0 进行苜蓿素油水分配系数的理论预测,结果为 $\log P = 1.65$,实测值和理论预测值结果相近。

6.3 药物吸收需要适宜的水溶性和脂溶性,即和油水分配系数有关,以便能透过生物膜脂质双分子层。正辛醇-水分配系数是研究药物表观油水分配系数的最好两相体系,在预测药物定量结构-吸收上具有重要意义^[4]。一般认为最佳 P 值在 $-1 < \log P < 2$ ^[5],本实验测得苜蓿素的油水分配系数 $\log P = 1.66$,表明其透过生物膜的性能较好。

6.4 体内胃肠道 pH 范围在 1.2~7.8,本实验测定了苜蓿素在该 pH 范围内的表观油水分配系数,结果表明,随溶液 pH 的增大,油/水分配数降低。但变化的幅度仍在最佳 P 值范围内,提示其在整个胃肠道均有较好的吸收。本研究为苜蓿素制剂的开发提供了参考。

参考文献

- 1 WU Yan-hong(吴燕红),ZHANG Rui(张锐),WANG Shao-jun(王少军) *et al.* Studies on the chemical constituents of bamboo root (I) [竹根化学成分的研究(I)]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药) 2009 20(10):2404
- 2 ZHANG Jing(张靖),WANG Ying(王英),ZHANG Xiao-qi(张晓琦) *et al.* Chemical constituents from the leaves of *Lophatherum gracile* (淡竹叶化学成分研究). *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2009 7(6):428
- 3 Verschoye RD, Greaves P, Cai H *et al.* Preliminary safety evaluation of the putative cancer chemopreventive agent tricin, a naturally occurring flavone. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006 57(1):1
- 4 Andersson JT, Schrader W. A method for measuring n -octanol/water partition coefficients. *Anal Chem* 1999 71:3610
- 5 Abraham DJ. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. Vol 2: Drug Discover and Drug Development. 6th ed. New Zealand: John Wiley&Sons Inc. 2003. 249
- 6 ZHANG Rui(张锐),LIU Jian-qun(刘建群),LIU Li-yan(刘丽艳) *et al.* Preparation of tricin from *Bambusa textilis* by preparative HPLC(制备高效液相色谱从竹根中制备苜蓿素的研究). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药) 2010 41(12):1985
- 7 LI Cun-man(李存满),LI Lan-fang(李兰芳),ZHANG Qin-zeng(张勤增). HPLC determination of tricin in *Medicago sativa* L. (高效液相色谱法测定苜蓿中苜蓿素的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志) 2006 26(4):494

(本文于2011年7月6日修改回)

《周海钧论文集》已出版

中国食品药品检定研究院李云龙院长组织编辑的《周海钧论文集》由中国人口出版社于2010年9月出版。2010年中国药品生物制品检定所(中检所)迎来了60华诞。在中检所60华诞之际,编辑出版老一代中检人的论著文集,让人们了解中国药检人的奋斗历程,从对历史的回顾中看看中检人在药检领域的发展过程的拼搏与付出。中检所涉及多学科的药品检验检测及相关专业,前辈们在各个专业领域的成绩均是中检所的宝贵财富。收集整理这些财富,系统而忠实地记录中检人在各专业的成就和历程。论著集的收集编辑工作,以体现专业性为主线,反映团队成就为宗旨,并以年代代表人物冠以书名编辑成册。《周海钧论文集》以周海钧先生本人独著为主,也收集了部分周海钧先生与其他作者合著论文和书籍。论文以全文刊载,著作刊载前言或序、著者、目录或摘要等。对论文有贡献的中检所其他老专家作者还有张银如、田颂九、金少鸿、朱燕、夏迺华、夏振民、赵雅灵、杨正时等。对专著有贡献的中检所老专家还有汪开敏、李九丹、杨兆起、王宝霖、陈德昌、桑国卫、孙曾培、唐秋瑾、徐康森、陈香元、王利生等。本论文集的编辑出版蕴涵了对以他们为代表的老一代专家们为中检所发展所作贡献的由衷敬重。

本书定价158.00元。联系人:刘小帅;电话:010-67095201;地址:100050北京市东城区天坛西里2号中国食品药品检定研究院《药物分析杂志》编辑部