

化学动力学法研究 4 种光源对二苯乙烯苷稳定性的影响^{*}

王贵芳, 任晓亮, 欧阳慧子, 戚爱棣^{**}, 赵敏

(天津中医药大学中药学院, 天津 300193)

摘要 目的: 研究二苯乙烯苷在水溶液中于不同光照条件下的稳定性, 并探索二苯乙烯苷在自然光和不同光源下稳定性的等效关系。**方法:** 采用高效液相色谱(HPLC)法考察不同温度下(34, 44, 50, 60 °C)于缓冲溶液中二苯乙烯苷在避光、白炽灯、荧光灯及紫外灯照射下的含量变化, 采用动力学的方法分析其光稳定性规律。**结果:** 二苯乙烯苷在自然光照、恒温避光和不同光源恒温加速实验中的反应均遵循一级动力学规律。根据 Arrhenius 方程, 计算得到实验条件下二苯乙烯苷在白炽灯、荧光灯、紫外灯照射下的反应活化能分别为 50.5, 36.6, 28.7 kJ · mol⁻¹; 光化反应产物为顺式二苯乙烯苷。**结论:** 二苯乙烯苷的水溶液在光照条件下不稳定, 不同光源对反应速率有较大影响, 其转化途径为顺反异构化。

关键词: 二苯乙烯苷; 光稳定性; 动力学

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)03-0458-05

Stability study of stilbene glucoside by chemical kinetics under four illuminant using^{*}

WANG Gui-fang, REN Xiao-liang, OU-YANG Hui-zi,

QI Ai-di^{**}, ZHAO Min

(College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract Objective: To study the stability of stilbene glucoside(THSG) in aqueous solution under different illumination, and to find the stability time-effect relationship of THSG in different illuminant. **Methods:** The content of THSG, away from light or under different illuminant (incandescent light, fluorescent, ultraviolet) in different temperatures (34, 44, 50, 60 °C), were studied by HPLC, UV spectrum and HPLC-MS. The photostability regularity of THSG was evaluated using chemical kinetics. **Results:** The reaction of THSG under different illuminant followed the first-order kinetics. According to arrhenius equation, the activation energy (E_a) of photochemical reactions under incandescent light, fluorescent, ultraviolet were 50.5, 36.6 and 28.7 kJ · mol⁻¹, respectively. And the product was *cis*-2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2-O- β -D-glycoside. **Conclusion:** THSG in phosphate buffer was instability under different illumination. The rate of photochemical reaction was significantly different between different illuminant. And the product was *cis*-2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2-O- β -D-glycoside.

Key words: stilbene glucoside(THSG); photostability; dynamics

何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb.)系蓼科植物何首乌的根与根茎,具有乌须发、益精血、补肝肾、抗衰老之效^[1]。二苯乙烯苷(THSG),化学名为2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷(*2,3,5,4'*-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glycoside),为何首乌的主要水溶性成分,现代药理

研究表明 THSG 具有抗氧化、提高免疫力、抑制血小板聚集、舒张血管等作用。笔者前期研究了 THSG 水溶液在不同 pH 及不同温度下的稳定性,结果表明 THSG 在水溶液中较不稳定,反应符合一级动力学规律,且反应速率随 pH 的增大及温度的升高而逐渐增大(另文刊发)。研究中还发现,THSG 对光

^{*} 高等学校博士学科点专项科研基金(20070063003)

^{**} 通讯作者 Tel: (022) 23051114; E-mail: qiaidi@tjutcm.edu.cn

极为敏感,因此,本实验首次对 THSG 采用动力学方法,研究其不同光照条件下光化反应的规律并分析其转化途径,为含有 THSG 新药的开发及应用提供科学参考。

1 仪器与试剂

仪器: Waters 600E 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); AX205 分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Finnigan LCQ Advantage Max 离子阱质谱仪(美国 Thermo 公司); XW-80A 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂); 恒温水浴(天津市泰斯特仪器有限公司); Cary50 型紫外分光光度计(美国 Varian 公司); TES-1332A 数位式照度计(泰仕电子工业股份有限公司); 9 W MT-205 荧光灯(欧雅仕电器照明有限公司); 20 W 白炽灯(荷兰飞利浦电子公司); 9 W 紫外高压汞灯(上海威丰灯泡厂)。

试剂: 二苯乙烯苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号: 110844-200606); HPLC 分析用乙腈、甲醇均为色谱纯(天津市康科德科技有限公司); 超纯水(Millipore 超纯水净化系统制得); 氢氧化钠、磷酸二氢钾均为分析纯。

2 检测条件

HPLC 分析条件: 色谱柱: Supelcosil LC-ABZ + P(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 采用乙腈-水(25:75)等度洗脱; 检测波长: 320 nm; 流速: 1 mL · min⁻¹; 进样量: 10 μL。

HPLC-MS 分析条件: 色谱条件同上,柱后 1:4 分流进入质谱,ESI 离子源,Sheath Gas: 20, Sweep Gas: 5, Capillary Temp: 270 °C, Spray Voltage: 3.5 kV, 正负离子模式监测 m/z 100-1000 的总离子流(TIC)。

3 溶液的配制

缓冲溶液: 称取磷酸二氢钾固体 5.44 g,加纯水 200 mL 溶解,得 0.2 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液; 称取氢氧化钠固体 0.80 g,加纯水 100 mL 溶解,得 0.2 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液; 将 125 mL 磷酸二氢钾溶液和 59 mL 的氢氧化钠溶液混合后,用纯水稀释至 500 mL,得 pH = 6.8 的缓冲溶液。

样品溶液: 取 THSG 对照品约 10 mg,精密称定,置于 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,得 THSG 储备液,储备液和缓冲溶液均避光放置在 4 °C 冰箱中。精密吸取此储备液 100 μL 于 10 mL 透明量瓶中,用 pH = 6.8 的缓冲溶液定容至刻度,摇匀即得样品溶液。

4 光照实验

自然光照: 自然光因照度变化较大,其光照量不能简单地用照度 E 与时间 t 的乘积度量,而需用其积分值 $\int_0^t E dt$ 来计算^[3]。实验中将照度计探头及样品同时置于室内近窗户处,每隔 10 min 记录室内漫射光瞬时光照度,采用公式 $E_{\text{累积}} = \sum E_i \times \Delta t$,计算各个取样时间点自然光的累积光强度; 并定时取出样品适量,色谱条件下测定 THSG 含量^[3]。

恒温避光加速: 将样品溶液置于棕色量瓶中,分别放入 34, 44, 50, 60 °C 恒温水浴中,定时取出样品适量,迅速冷却至室温,色谱条件下测定 THSG 含量。

恒温光照加速: 将样品溶液置于透明量瓶中,温度条件与恒温避光加速实验一致,分别采用白炽灯、荧光高压汞灯、紫外高压汞灯为光源^[3~5],将样品溶液置于距各光源适当距离处(采用稳压电源稳压),在样品处测定照度 E 并记录光照时间 t ,计算光照量($E t$),定时取出样品适量,迅速冷却至室温,色谱条件下测定 THSG 含量^[3]。

5 结果

5.1 HPLC 方法学的验证 在 HPLC 上建立 THSG 的定量分析方法,THSG 可在 10 min 内完成检测(保留时间 8.5 min),空白缓冲液和降解产物均不干扰测定; 以峰面积为纵坐标(Y),浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,得回归方程为:

$$Y = 32017X - 6237.8 \quad r = 0.9999$$

表明 THSG 在 0.5 ~ 50 μg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好; 定量下限为 0.1 μg · mL⁻¹ ($S/N = 10$); 同一样品溶液(5 μg · mL⁻¹) 连续进样的精密密度 RSD = 1.6% ($n = 6$)。

5.2 自然光光照实验 以 $\ln(C_t/C_0)$ 对累计光照量 $E t$ 做线性回归,得相关系数 $r = 0.998$,表明 THSG 在缓冲溶液中于自然光照射下的含量变化遵从一级动力学规律,结果见图 1。根据一级动力学方程 $\ln C = \ln C_0 - k E t$,可知 THSG 在自然光照射下的反应速率常数 $k = 1.746 \times 10^{-7} \text{ lx}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,计算得 THSG 含量下降 50% 所需的光照量 $E t = \ln(C_0/C) / k = 1102.5 \text{ lx} \cdot \text{h}$ 。本实验中测得天津地区晴天上午 9:00 至下午 17:00 靠近窗户处的室内光照度在 600 ~ 3600 lx 之间,而室内漫射光的平均光照量为 170 lx^[6],以室内漫射光的光照度推测 THSG 在室温漫射光条件下的 $t_{1/2} = 6.49 \text{ h}$ 。

5.3 恒温避光加速实验 以 $\ln(C_t/C_0)$ 对时间 t 做线性回归,可得避光时不同温度下,THSG 在缓冲溶液中的含量随时间变化遵循一级动力学,结果见图 2。

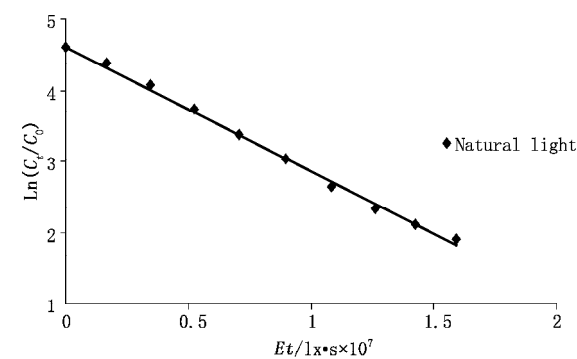


图1 THSG 自然光照射后相对剩余含量对数值($\ln C_t/C_0$) 与累积光照量关系图

Fig 1 The relationship between the logarithms of residual content($\ln C_t/C_0$) and accumulative illumination after exposure to the natural light for THSG

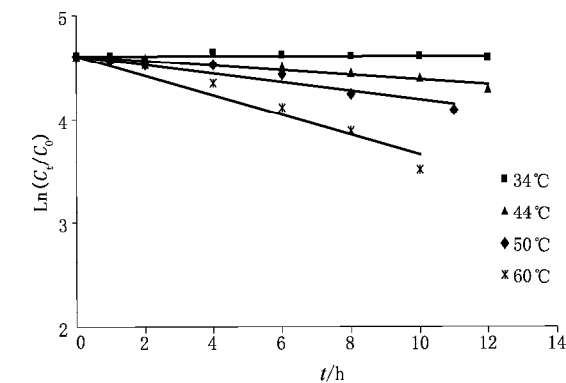


图2 THSG 避光条件下相对剩余含量对数值($\ln C_t/C_0$) 与时间关系图

Fig 2 The relationship between the logarithms of residual content($\ln C_t/C_0$) and time in dark for THSG

由图2可知样品溶液的含量变化在各实验温度下遵从一级动力学规律。计算可得各温度下的反应

速率常数 k ,利用 Arrhenius 方程,以 $\ln k$ 对 $1/T$ 做线性回归,由直线的斜率可求得样品溶液在避光条件下的活化能 $E_a = -R \times \text{斜率}$,由截距可得指前因子 A ,结果见表1,预测其在室温(25 ℃) 条件下的 $t_{1/2} = 4950 \text{ h}$ 。

表1 恒温避光加速实验中 THSG 样品溶液的动力学参数
Tab 1 Kinetic parameters for THSG in isothermal experiment in dark

Temp. /℃	k/h^{-1}	r	$t_{1/2}/\text{h}$
34	5.0×10^{-4}	0.81	1386
44	2.2×10^{-2}	0.97	31.5
50	4.1×10^{-2}	0.96	16.9
60	9.4×10^{-2}	0.97	7.37
$E_a/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	168.6		
A/h^{-1}	59.2		

5.4 恒温光照加速实验 以 $\ln(C_t/C_0)$ 对累计光照量 Et 做线性回归,可得样品溶液在不同光源、不同温度下的含量随光照量 Et 变化曲线,结果见图3~5,在34 ℃不同光源照射下的含量变化规律见图6。由图3~5可知样品溶液的含量变化在各实验温度下遵从一级动力学规律,计算可得各种光源在各温度下的反应速率常数 k_{light} ,利用 Arrhenius 方程,以 $\ln k$ 对 $1/T$ 做线性回归,由直线的斜率可求得样品溶液在不同光源照射下的活化能 $E_{a,\text{light}} = -R \times \text{斜率}$,由截距可得指前因子 A_{light} ,同时推测出室温(25 ℃) 条件,白炽灯、荧光灯、紫外灯在实验所用照度条件下 THSG 的半衰期 $t_{1/2}$ 分别为 36.92 h、17.39 h、5.06 h,结果见表2。

表2 恒温光照加速实验中 THSG 样品溶液的动力学参数
Tab 2 Kinetic parameters for THSG in isothermal experiment under illumination

温度计 (Temp) /℃	白炽灯 (incandescent lamp) / $E = 660 \text{ lx}$			荧光灯 (fluorescent lamp) / $E = 733 \text{ lx}$			紫外灯 (ultraviolet lamp) / $E = 169 \text{ lx}$		
	$k/\text{lx}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \times 10^{-7}$	r	$t_{1/2}/\text{h}$	$k/\text{lx}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \times 10^{-7}$	r	$t_{1/2}/\text{h}$	$k/\text{lx}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \times 10^{-6}$	r	$t_{1/2}/\text{h}$
34	0.13	0.98	22.44	0.23	0.99	11.42	0.32	0.99	3.56
44	0.30	0.97	9.72	0.37	0.97	7.10	0.45	0.99	2.53
50	0.39	0.99	7.48	0.44	0.99	5.97	0.58	0.99	1.96
60	0.62	0.97	4.70	0.72	0.98	3.69	0.76	0.98	1.50
$E_{a,\text{light}}/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	50.5			36.6			28.7		
$A_{\text{light}}/\text{lx}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	1.73			-3.24			-3.71		

5.5 不同光源对样品溶液稳定性影响的等效关系
实验中因自然光照度变化较大且常受到气候环境等

因素的影响,故以自然光为光源研究药物的稳定性,有较大的局限性。为了规范地反映自然光对 THSG

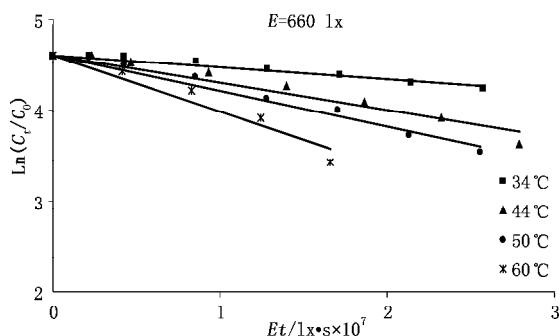


图3 THSG 白炽灯照射后相对剩余含量对数值 ($\ln C_t/C_0$) 与累积光照量关系图

Fig 3 The relationship between the logarithms of residual content ($\ln C_t/C_0$) and accumulative illumination after exposure to the incandescent lamp for THSG

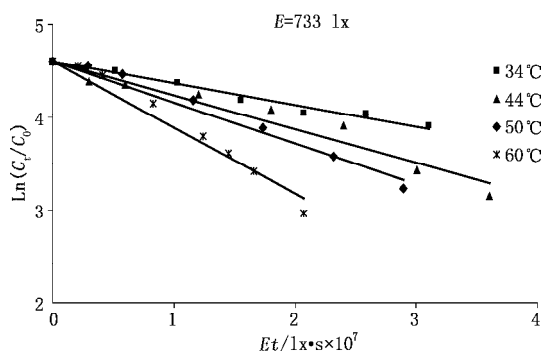


图4 THSG 荧光灯照射后相对剩余含量对数值 ($\ln C_t/C_0$) 与累积光照量关系图

Fig 4 The relationship between the logarithms of residual content ($\ln C_t/C_0$) and accumulative illumination after exposure to the fluorescent lamp for THSG

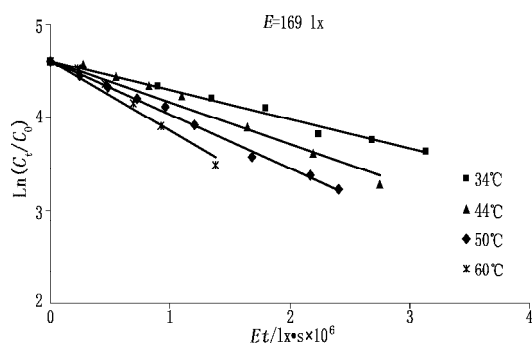


图5 THSG 紫外灯照射后相对剩余含量对数值 ($\ln C_t/C_0$) 与累积光照量关系图

Fig 5 The relationship between the logarithms of residual content ($\ln C_t/C_0$) and accumulative illumination after exposure to the ultraviolet lamp for THSG

在缓冲溶液中稳定性的影响并准确地预测其在室内自然光照射下的贮存期,本实验利用 THSG 在不同灯光照射下的含量变化规律,根据一级动力学方程求得 THSG 反应至某种程度时,不同光源光照量之间的等效关系。不同光源光照量之间的等效数量关系式^[14]为:

$$(Et)_{\text{Daylight}} = (Et)_{\text{Lamp}} K_{\text{Lamp}} / K_{\text{Daylight}}$$
 结果见图 7。

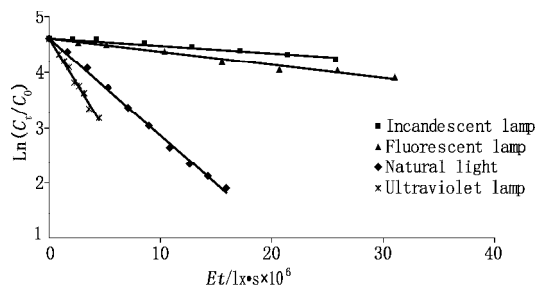


图6 THSG 不同光源照射后(34℃)相对剩余含量对数值 ($\ln C_t/C_0$) 与累积光照量关系图

Fig 6 The relationship between the logarithms of residual content ($\ln C_t/C_0$) and accumulative illumination after exposure to the different illuminant (34℃) for THSG

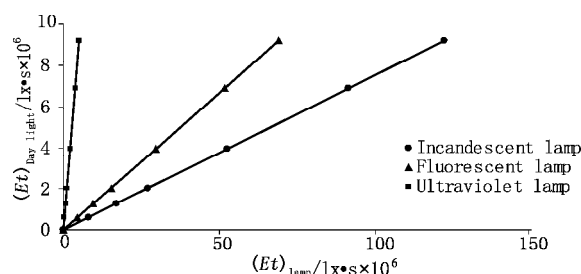


图7 不同光源和自然光对 THSG 含量变化影响的等效关系

Fig 7 The equivalent accumulative illumination relationship between natural light and incandescent lamp, fluorescent lamp, ultraviolet lamp for THSG

6 讨论

6.1 THSG 在缓冲溶液中,光照条件下反应迅速,不同光源对 THSG 的光化反应速率有较大影响,低波长的紫外光影响尤其明显;根据不同光源对 THSG 稳定性影响的等效关系,预测 THSG 在 pH = 6.8 的缓冲溶液中,室温自然光照射下的 $t_{1/2}$ 为 6.49 h,而 THSG 在避光条件下较为稳定,其室温下的 $t_{1/2}$ 为 4950 h,表明光照是影响 THSG 稳定性的主要因素。

6.2 实验中发现,随着 THSG 含量的下降,其色谱峰前 $t_R = 5.1$ min 处出现了一个新的色谱峰,且其峰面积随着 THSG 峰面积的降低而逐渐增大,见图 8;紫外光谱显示随着光照时间的延长,THSG 的吸光度逐渐下降,且其最大吸收波长发生了紫移(由 320 nm 至 285 nm),结果见图 9。有文献报道 THSG 在光照条件下会发生顺反异构化,由反式定量地转化为顺式结构^[11],本实验利用液质联用技术分析,MS 及 MS/MS 的结果显示 THSG 及其光降解产物在正负离子模式下均有相似的准分子离子峰,证明 THSG 在光照条件下的含量下降不是发生了降解反应而是由反式向顺式转化。

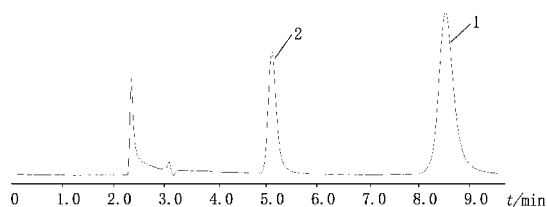


图8 THSG 及其光化产物 HPLC 色谱图

Fig 8 HPLC chromatogram of THSG and product

1. THSG 2. 产物(product)

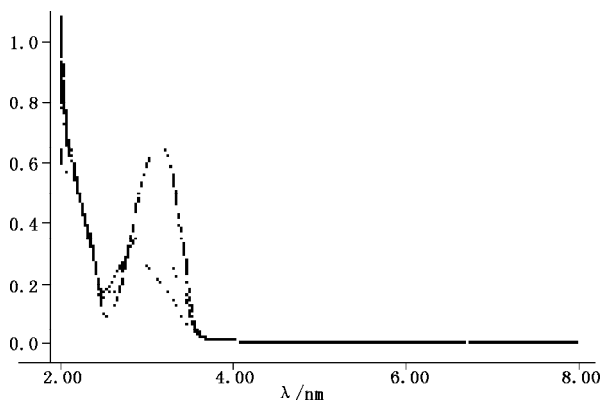


图9 THSG 在光照条件下紫外吸收光谱随时间变化规律

Fig 9 The relationship between UV spectrum and time for THSG

6.3 天然存在于何首乌中的 THSG 为反式 THSG 烯苷,实验结果表明其在光照条件下可发生顺反异构而转化为顺式 THSG,今后应对顺式 THSG 的生物活性、毒性等加以研究,以期更合理地评价光致异构对 THSG 用药有效性和安全性的影响^[12,13]。

参考文献

- Ryu G, Ju J H, Park Y J, *et al.* The radical scavenging effects of stibene glucosides from Polygonum multiflorum. *Archiv Pharm Res*, 2002, 25(5): 636
- LI Zhi-yi(李志毅), ZHAN Xian-cheng(詹先成), LI Lin-li(李琳丽), *et al.* Effect of light and heat on the stability of furacilin aqueous solution(光和热对呋喃西林水溶液稳定性的影响). *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2002, 37(2): 148
- YANG Ya-li(杨亚莉), HU Chang-qin(胡昌勤), JIN Shao-hong(金少鸿). Study on the photostability of four fluoroquinolones in aqueous solution(4种氟喹诺酮类抗生素水溶液的光稳定性研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2004, 24(1): 71
- Al Omari MM, Zoubi RM, Hasan EI, *et al.* Effect of light and heat on the stability of montelukast in solution and in its solid state. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 45(3): 465
- Rivas-Granizo P, Santos SR C J, Ferraz HG. Development of a stability-indicating LC assay method for determination of chloroquine. *Chromatographia*, 2009, 69: 137
- Wu ZM, Tucker IG, Razzak M, *et al.* Stability of ricobendazole in aqueous solutions. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(5): 1282
- LIN Tao(林涛), ZHAN Xian-cheng(詹先成), LI Kai-lan(李开兰). Influence of light and temperature on the stability of procaine hydrochloride injection(光和温度对盐酸普鲁卡因注射液稳定性的影响). *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2004, 39(8): 645
- HE Lin(何琳). Study on the photostability of furazolidone tablets(呋喃唑酮片的光稳定性). *Anhui Med Pharm J*(安徽医药), 2003, 7(5): 380
- Breier AR, Steppe M, Schapoval EES. Photodegradation kinetics of fexofenadine hydrochloride using a LC method. *Chromatographia*, 2006, 64(11-12): 725
- LI Lin-li(李琳丽), FAN Shi-de(范世德). Obtaining daylight photostability of furosemide injection from lamplight exposure experiments(呋塞米注射液在自然光及灯光照射下的稳定性研究). *West China J Pharm Sci*(华西药学杂志), 2000, 15(1): 4
- SUN Jin-ling(孙晋苓), HUANG Xiao-lan(黄晓兰), WU Hui-qin(吴惠勤), *et al.* Determination of content and light stability of cis- and trans-2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside in radix Polygoni multiflori by HPLC/DAD/MS(何首乌中顺式和反式-二苯乙烯苷的 HPLC/DAD/MS 测定及其光稳定性考察). *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2009, 44(7): 541
- Grobelyni P, Viola, G, Vedaldi D, *et al.* Photostability of pitavastatin-A novel HMG-CoA reductase inhibitor. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50(4): 597
- Kazlauskas K, Mikulenaite J, Karpicz R, *et al.* Photostability of phenothiazinyl-substituted ethylenes. *Dyes Pigments*, 2009, 83(2): 168

(本文于2010年5月7日收到)